



Année :

N°

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Spécialité : Toxicologie

Alix Leblanc

Effets d'un mélange de polluants organiques persistants sur le métabolisme hépatique

Soutenue le

Laboratoire « Toxicologie, Pharmacologie et signalisation cellulaire »

INSERM UMR-S 1124

Jury

Dr Laurence PAYRASTRE

Rapporteur

Pr Lydie SPARFEL-BERLIVET

Rapporteur

Pr Sophie GIL

Examineur

Dr Emmanuel LEMAZURIER

Invité

Dr Martine AGGERBECK

Directeur de thèse

Dr Etienne BLANC

Co-directeur de thèse

Table des matières

Abréviations	5
Table des figures	10
Introduction	11
1 La TCDD	15
1.1 Les origines	15
1.2 Les voies d'exposition	16
1.3 Les effets de la TCDD	16
1.3.1 Chez les animaux	16
1.3.2 Chez l'Homme	17
1.4 Voie de signalisation du récepteur aux hydrocarbures aromatiques	18
1.4.1 Structure, localisation et ligands du AhR	18
1.4.1.1 Structure du AhR	18
1.4.1.2 Localisations et ligands du AhR	19
1.4.2 Mode d'action	20
1.4.3 Rôles du AhR	21
2 L'α-endosulfan	23
2.1 Les origines et propriétés physico-chimiques	23
2.2 Les voies d'exposition	25
2.3 Les effets de l'endosulfan	26
2.3.1 Chez les animaux	26
2.3.2 Chez l'Homme	27
2.4 Voie de signalisation du Récepteur aux œstrogènes	27

2.4.1	Ligands, localisation et structure	27
2.4.1.1	Les œstrogènes et ligands exogènes des récepteurs aux œstrogènes	27
2.4.1.2	Structure et localisation des récepteurs aux œstrogènes	28
2.4.2	Mode d'action	30
2.4.3	Rôle du ER	30
3	Les mélanges	34
3.1	La problématique des mélanges	34
3.2	Concept de base	35
3.3	Le "crosstalk" AhR/ER	37
4	Polluants organiques persistants et métabolisme glucidique et lipidique	40
4.1	Métabolisme glucidique	40
4.1.1	La glycolyse	41
4.1.2	la voie du glycogène	43
4.1.3	la néoglucogenèse	43
4.2	Le métabolisme des lipides	44
4.2.1	Les acides gras	44
4.2.1.1	Biosynthèse des acides gras	44
4.2.1.2	Catabolisme des acides gras : la β oxydation	45
4.2.2	Les triglycérides	45
4.3	Pathologies métaboliques, lipidiques et le syndrome métabolique	47
4.3.1	Les pathologies métaboliques	47
4.3.1.1	Les maladies métaboliques génétiques	47
4.3.1.2	Les maladies métaboliques acquises	48
4.3.2	Les pathologies lipidiques	49
4.3.2.1	La stéatose et son évolution	49
4.3.2.2	L'athérosclérose	50
4.3.3	Le syndrome métabolique	51
4.4	Effets des POP sur le métabolisme glucidique et lipidique	53
4.4.1	Effets de la TCDD et d'autres agonistes du AhR sur le métabolisme . . .	55
4.4.1.1	Chez l'animal	55
4.4.1.2	Chez l'Homme	57

4.4.2	Effets de l'endosulfan et d'autres agonistes du ER sur le métabolisme . . .	59
4.4.2.1	Chez l'animal	59
4.4.2.2	Chez l'Homme	60
4.4.3	Effets des mélanges sur le métabolisme	61
Le modèle utilisé : les cellules Hepa RG		63
Objectif du travail de thèse		66
Résultats expérimentaux		67
1	Etude n°1 : étude du transcriptome des cellules HepaRG traitées par le mélange TCDD/α endosulfan	68
1.1	Introduction	68
1.2	Conclusion	132
2	Etude n°2 : un mélange de POP diminue la néoglucogenèse et la glycolyse dans la lignée hépatique humaine HepaRG	134
2.1	Introduction	134
2.2	résultats complémentaires	173
2.2.1	La piste des lipides	173
2.2.2	Résultats préliminaires <i>in vivo</i>	173
2.3	Conclusion	176
3	Etude n°3 : Nouveau rôle du AhR et de l'ARNT dans la régulation des Alcool Déshydrogénases	182
3.1	Polluants organiques persistants et métabolisme de l'alcool	182
3.1.1	Métabolisme de l'alcool	182
3.1.2	Les pathologies hépatiques	184
3.1.3	Effet des agonistes du AhR sur le métabolisme de l'alcool	185
3.2	Etude	185
3.2.1	Introduction	185
3.2.2	Conclusion	216
Conclusion et perspectives		218

Bibliographie	225
----------------------	------------

Abréviation

ADH : Alcool DésHydrogénase

AG : Acide Gras

AGR2 : Anterior GRadient 2

AGS : Acide Gras Synthase

AHA : American Heart Association

AhR : Aryl hydrocabon Receptor

ALDH : Aldéhyde DésHydrogénase

AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique

AR : Androgen Receptor

ARNT : AhR Nuclear Translocator

ATP : Adénosine TriPhosphate

bHLH PAS : basic Helix Loop Helix Per-ARNT-Sim

BMI : Body Mass Index

BPA : BisPhenol A

CAR : Constitutive Androstane Receptor

CARDIA : Coronary Artery Risk Development in Young Adults study

CAT : Carnitine Acyl Transferase

CK : CytoKeratine CoA : Co-enzyme A

CYP : Cytochrome P450

DBD : DNA Binding Domain

DDD : DichloroDiphénylDichloroéthane

DDE : DichlorophénylEthane

DDT : DichloroDiphénylTrichloroéthane

DEHP : Di(2-EthylHexyl)Phtalate

DJA : Dose Journalière Admissible
DRB : 5,6-Dichloro-1- β -D-RibofuranosylBenzimidazole
E1 : œstrone
E2 : œstradiol
E3 : œstriol
EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments
EGF : Epidermal Growth Factor
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
EMX : Enzymes du métabolisme des Xénobiotiques
EPA : Environmental Protection Agency
ER : Estrogen Receptor
ERE : Estrogen Responsive Element
FADH : Flavine adénine dinucléotide
FASN : Fatty Acid Synthase
FDA : Food and Drug Administration
FICZ : 6-formylindolo[3,2-b]carbazole
G3P : Glycéraldéhyde 3 phosphate
G6P : Glucose 6 Phosphate
G6Pc : Glucose 6 Phosphatase, sous-unité catalytique
GABA : Acide Gamma-AminoButyrique
GK : GlucoKinase
GYP : GLYcogene Phosphorylase
GYS : GLYcogene Synthase
HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HCB : HexaChloroBenzène
HCH : HexaChlorocycloHexane
HDL : High Density Lipoprotein
HDLc : High density Lipoprotein cholesterol
Hif : Hypoxia Inducible Factor
HK : HexoKinase
HMGCS1 : Hydroxy-3-MethylGlutarylCoA Synthase 1
Hsp90 : Heat Shock Protein 90

IARC : Agence Internationale de la Recherche sur le Cancer
ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule 1
IDF : International Diabetes Federation
IHH : Immortalized Human Hepatocyte
ITE : 2-(1'H-indole-3'-carbonyl)-thiazole-4-carboxylic acid methyl ester
iXRE : inhibitory Xenobiotic Responsive Element
KO : Knock Out
LBD : Ligand Binding Domain
LDL : Low Density Lipoprotein
LDLR : Low Density Lipoprotein Receptor
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MUP : Major Urinary Protein
NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide
NCEP-ATP III : National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III
NES : Nuclear Export Signal
NHLBI : National heart Lung and Blood Institute
NIEHS : National Institute of Environmental Health Sciences
NIOSH : National Institute of Occupational Safety and Health
NLS : Nuclear Localisation Signal
NOAEL : No Observed Adverse Effect Level
NOEL : No Observed Effect Level
NTP : National Toxicology Program
PPAR : Peroxisome Proliferator Activated Receptor
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PA : Pression Artérielle
PAD : Pression Artérielle Diastolique PAS : Pression Artérielle Systolique
PAT : Palmitoyl Acyl Transferase
PC : Pyruvate Carboxylase
PCB : PolyChloroBiphényle
PCDD : PolyChloroDibenzoDioxine
PCDF : PolyChloroDibenzoFurane
PEPCK : PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase

PEPCKc : PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase cytosolique
PEPCKm : PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase mitochondriale
PHH : Hépatocyte Primaire Humain
Pk : Pyruvate Kinase
PXR : Pregnane X Receptor
POP : Polluants Organiques Persistants
REACH : Registration, Evaluation, Authorization of CHemicals
QSAR : Quantitative Structure-Activity Relationship
ROS : Reactive Oxygen Species
SHNA : Stéatose Hépatique Non Alcoolique
TCDD : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine
TEF : Toxic Equivalency Factor
TG : TriGlycérade
TiPARP : TCDD inducible Poly ADP-Ribose Polymerase
VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VLDL : Very Low Density Lipoprotein
XRE : Xenobiotic Responsive Element

Table des figures

1	Classement des POP par la convention de Stockholm.	13
2	Formule chimique de la 2,3,7,8-TétraChloroDibenzo-p-Dioxine	15
3	Structure du récepteur aux aryl hydrocarbures.	18
4	Schéma de la voie de signalisation du AhR.	20
5	Structure chimique de l' α -endosulfan et du β -endosulfan	24
6	Structure chimique des métabolites de l'endosulfan	25
7	Structure du récepteur aux œstrogènes.	29
8	Schéma des différentes voies d'activation du récepteur aux œstrogènes	31
9	Récapitulatif de l'action des œstrogènes dans l'homéostasie du glucose et le métabolisme énergétique, dans un contexte "physiologique normale" (panneau de gauche) et au cours de la ménopause (panneau de droite).	33
10	Schéma des méthodes d'évaluation des risques de mélanges de polluants.	36
11	"Crosstalk" entre la voie du AhR et du ER.	39
12	Schéma récapitulatif et simplifié du métabolisme glucidique dans l'hépatocyte.	41
13	Schéma de la synthèse des AG.	46
14	Schéma de la β oxydation des AG.	47
15	Schéma de l'évolution d'une stéatose hépatique	50
16	Schéma de l'évolution de l'athérosclérose	52
17	Comparaison des définitions du syndrome métabolique	54
18	Photographie des cellules HepaRG indifférenciées et différenciées.	65
19	Schéma expérimental de la cinétique des expériences de marquage au Red Oil.	174
20	Photographie des cellules HepaRG traitées par les polluants, en présence ou non de palmitate-BSA 100 ou 150 μ M, puis marquées au Red oil O.	174

21	Étude des effets d'une injection par semaine de 0.1, 1, 10 et 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de TCDD pendant six semaines chez les souris mâles.	175
22	Étude des effets d'une injection par semaine de 0.1, 1, 10 et 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de TCDD pendant six semaines chez les souris femelles.	176
23	Schéma des différents modifications induites par le mélange sur le métabolisme.	179
24	Schéma du la position des ADHs sur le chromosome 4.	183
25	Schéma du métabolisme de l'alcool.	183
26	Schéma récapitulatif de régulations induites par les polluants et hypothèse de la voie des pentoses phosphate.	222

Introduction

De nos jours, l'Homme est de plus en plus exposé à toutes sortes de produits chimiques que ce soit de manière volontaire (exemple : les médicaments, le tabac) ou involontaire (exemple : les pesticides). A partir des années 50, l'industrie a connu une forte croissance, entraînant l'apparition de milliers de nouvelles molécules. Certaines de ces nouvelles molécules sont qualifiées de xénobiotiques et définies comme de petites molécules étrangères à l'organisme et lipophiles.

Cette production incontrôlée de xénobiotiques a entraîné des effets néfastes pour l'Homme et les écosystèmes, illustrés par exemple par l'utilisation du pesticide dichlorodiphényltrichloroéthane (DTT); il fut l'insecticide le plus utilisé au début de la seconde guerre mondiale pour les cultures agricoles et pour lutter contre les vecteurs de maladies graves, comme le paludisme ou la malaria. En 1962, Rachel Carson dénonça les effets néfastes du DTT sur la reproduction des oiseaux dans son livre "Silent spring"; ce dernier entraîna des études écotoxicologiques qui aboutirent à son interdiction dans certains pays à partir des années 70 [Rosner and Markowitz, 2013].

Par manque de contexte réglementaire, la toxicité de ces xénobiotiques était trop peu renseignée, voire pas du tout. Afin de protéger l'Homme et l'environnement, le Parlement européen a voté, en décembre 2006, la mise en place de la directive REACH (Registration, Evaluation, Authorization of CHemicals), entrée en application en juin 2007. Cette directive oblige les industriels, les importateurs et les utilisateurs, dans l'exercice de leurs activités industrielles ou professionnelles (différents des distributeurs et des consommateurs) à prouver que leurs produits sont inoffensifs pour l'Homme et les écosystèmes avant leur mise sur le marché ou leur utilisation. Il peut arriver que des produits ayant des effets nocifs soient quand même conservés si aucune alternative n'existe. REACH cible toutes les molécules ayant un tonnage annuel supérieur à une tonne, soit 30 000 molécules sur les 100 000 existantes en Europe (http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/chemicals/reach/index_fr.htm, http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/chemicals/reach/index_en.htm).

[//www.ineris.fr/fr/solution/html/118177/1755](http://www.ineris.fr/fr/solution/html/118177/1755)).

De plus, dans les années 1960, il avait été observé que certains xénobiotiques étaient retrouvés à des endroits où ils n’avaient jamais été utilisés et ce, des années après leur utilisation. Par exemple, la dieldrine qui est un insecticide organochloré et un sous-produit de l’aldrine (un autre insecticide organochloré), utilisé dans les années 1950 à 1970 (<http://www.epa.gov/pbt/pubs/aldrin.htm>), a été retrouvée dans la graisse des ours polaires [Sonne, 2010] et des goélands bourgmestres [Verreault et al., 2010] dans les régions arctiques. Afin de protéger au mieux la santé humaine et l’environnement contre ces molécules particulières, 92 pays ont signé la convention de Stockholm en mai 2001, pour faire suite au protocole d’Arrhus qui a pour but d’informer la population sur les polluants les plus nocifs. Cette convention a pour but de réduire et finalement d’éliminer l’utilisation et les rejets de ces polluants. Ces molécules organiques ont été appelées des Polluants Organiques Persistants (POP) et sont définies par la convention de Stockholm par 4 propriétés :

- toxicité (aiguë ou chronique) pour l’Homme et l’environnement.
- elles sont semi-volatiles, elles seront transportées, par voies aérienne ou aquatique, loin de leur source d’émission.
- elles sont lipophiles, elles vont donc être accumulées dans les tissus gras comme le tissu adipeux, le foie ou le cerveau des êtres vivants (Hommes et animaux), soit par ingestion directe soit par ingestion de proies contaminées (chaîne alimentaire).
- elles sont persistantes dans l’environnement, car elles résistent aux processus de dégradation qu’ils soient biologiques (métabolisme) ou physico-chimiques.

A sa création, la convention de Stockholm listait 12 POP, comprenant des pesticides et des produits chimiques industriels. Avec le temps, cette liste s’est allongée, jusqu’à introduire le pesticide Endosulfan comme le 22ème POP en mai 2011 (<http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/tabid/673/Default.aspx>) (figure n° 1).

Toutes ces mesures prises par différents pays du monde commencent à porter leurs fruits. En effet, les produits les plus dangereux sont maintenant interdits ou vont le devenir, les utilisateurs ont de plus en plus conscience du danger des produits qu’ils manipulent et se protègent en conséquence. Mais ces mesures ne considèrent que les effets d’une seule molécule sur les organismes vivants. Or, les organismes vivants sont exposés à des centaines, voire des milliers, de molécules en mélange. Ces études peuvent passer donc à côté de tout un pan de la toxicologie

		Origine	Annexe
12 POPs initiaux	Aldrine	pesticide	A
	Chlordane	pesticide	A
	DDT	pesticide	B
	Dieldrine	pesticide	A
	Endrine	pesticide	A
	Heptachlor	pesticide	A
	Hexachlorobenzène	pesticide, chimique industriel et sous produit	C
	Mirex	pesticide	A
	Taxophène	pesticide	A
	PCB	chimique industriel et sous produit	C
	PCDD	sous produit	C
	PCDF	sous produit	C
	Alpha hexachlorocyclohexane	pesticide et sous produit	A
	Beta hexachlorocyclohexane	pesticide et sous produit	A
	Chlordecone	pesticide	A
	Hexabromobiphenyl	chimique industriel	A
	Hexabromodiphenyl ether and heptabromodiphenyl ether (commercial octabromodiphenyl ether)	chimique industriel	A
	Lindane	pesticide	A
	Pentachlorobenzène	pesticide, chimique industriel et sous produit	A et C
	Perfluorooctane sulfonic acid, ses sels et le perfluorooctane sulfonyl fluoride	chimique industriel	B
	Endosulfan technique et ses isomères	pesticide	A
	Tetrabromodiphenyl ether et pentabromodiphenyl ether (pentabromodiphenyl ether commercial)	chimique industriel	A

FIGURE 1 – Classement des POP par la convention de Stockholm.

Signification des annexes : A : POP à éliminer, B : production et utilisation à restreindre, C : rejet involontaire à réduire.

potentielle de certaines molécules, qui semblaient inoffensives à elles seules.

Afin de protéger au mieux l'Homme et les écosystèmes, nous devons donc essayer de comprendre les effets de ces expositions multiples. Bien qu'étudier les effets de chaque mélange de molécules serait la solution idéale, cela est impossible à cause de leur nombre et de leur diversité. Par contre, ces xénobiotiques ne vont pouvoir se lier qu'à quelques protéines, dont des récepteurs qui vont relayer leurs effets. Nous allons donc utiliser des composés activant des voies de signalisation spécifiques via ces récepteurs. Nous avons choisi d'utiliser deux POPs, une dioxine, la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD), qui est la plus toxique des dioxines, et un pesticide, l' α -endosulfan, qui est l'isomère majeur et le plus toxique de ce pesticide organochloré. Ces deux polluants vont nous permettre d'activer différentes voies. La TCDD utilise la voie du AhR ("Aryl Hydrocarbon Receptor"), et l' α -endosulfan la voie du PXR (« pregnane X receptor ») ou du ER (« Estrogen Receptor »). De plus, ces deux polluants se retrouvent en mélange dans la réalité, car la synthèse de l'endosulfan peut entraîner la production de TCDD.

Chapitre 1

La TCDD

1.1 Les origines

Les Dioxines appartiennent à la famille des composés organochlorés. Elle regroupe des composés lipophiles ayant une structure chimique et des mécanismes d'action similaires. Cette famille regroupe les polychlorodibenzodioxines (PCDD), les polychlorodibenzofuranes (PCDF) et certains polychlorobiphényles (PCB) qui lient tous le même facteur de transcription, le récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR).

La TCDD (figure n°2), aussi connue sous le nom de dioxine de Seveso depuis l'accident industriel en Italie en 1976 [[Bertazzi et al., 2001](#)], est la dioxine la plus toxique. Cette molécule, très stable et persistante dans l'environnement, est l'un des ligands les plus affins du AhR, de l'ordre de 1 à 10nM en fonction des espèces. Les dioxines sont essentiellement produites par les diverses activités humaines ou naturelles au cours de combustions incomplètes (feu de bois, éruption volcanique, moteur à explosion, fumée de tabac ou incinération de déchets). Elles n'ont jamais été produites intentionnellement et ne sont que les sous-produits de réactions de

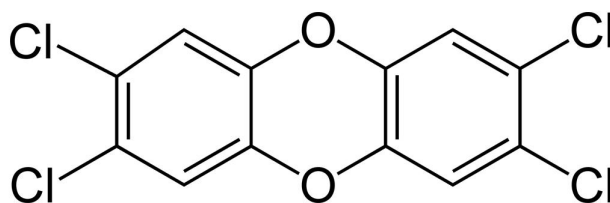


FIGURE 2 – Formule chimique de la 2,3,7,8-TétraChloroDibenzo-p-Dioxine

combustion en présence de chlore. Elles peuvent aussi être produites pendant la production de pâte à papier ou de pesticides chlorés comme l'endosulfan. Ces molécules sont difficilement éliminées de l'organisme et la demi-vie de la TCDD est de 7 à 9 ans dans le corps humain. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a fixé la dose journalière tolérée à 1 pg d'équivalent toxique par kilogramme de poids corporel et par jour. Le facteur d'équivalence toxique ou TEF ("Toxic Equivalency Factor") est un facteur de pondération qui indique la toxicité d'une substance par rapport à la TCDD, à laquelle la valeur de référence de 1 a été donnée. Il permet de fixer un facteur de sécurité et ainsi de protéger la population.

La concentration d'un est égale à (en ng TEF/nm³) :

$$= C1(ng/nm^3)xTEF1 + C2(ng/nm^3)xTEF2 + ... + Cn(ng/nm^3)xTEFn$$

Avec Cn, TEFn correspondant à la concentration et au TEF de chaque molécule.

1.2 Les voies d'exposition

Ces molécules liposolubles présentent plusieurs atomes de chlore (8 au maximum), dont le nombre et la position déterminent la stabilité des dioxines et entraîne leur bioconcentration dans la chaîne trophique. La principale voie d'exposition aux dioxines est la voie alimentaire ; celles-ci seront ensuite accumulées dans les graisses et le lait. L'exposition peut aussi se faire par voie aérienne, via les fumées et l'air. La majorité des effets de la TCDD est due à sa liaison au AhR mais il existe quelques effets indépendants de la voie AhR [[Grassman et al., 1998](#)].

1.3 Les effets de la TCDD

La majeure partie des effets de la TCDD passe par le AhR.

1.3.1 Chez les animaux

Des études ont montré que des souris sauvages traitées à la dioxine présentaient une atrophie du thymus, une activation de l'apoptose, une toxicité hépatique, une carcinogénèse au niveau du foie, des poumons et de la peau [[Camacho et al., 2005](#)]. Ces phénomènes peuvent s'expliquer par l'induction des enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX) par la TCDD, via le

AhR, qui entraîne une augmentation des ROS (« reactive oxygen species »); ce stress oxydant peut, par la suite, causer l'oxydation des bases de l'ADN, engendrer des cassures simple ou double brins et des anomalies chromosomiques [Alsharif et al., 1994] [Barouki et al., 2007]. Une exposition à long terme peut entraîner des perturbations du système immunitaire, du développement embryonnaire (apparitions d'une fente palatine) et du système nerveux central ainsi que de la fertilité [Dragin et al., 2006]. Chez la souris, la TCDD a été décrite comme pro-fibrotique [Pierre et al., 2014], mais aussi comme affectant la synthèse du cholestérol, des acides gras, et le métabolisme du glucose dans le foie [Sato et al., 2008].

1.3.2 Chez l'Homme

Les effets de la dioxine dépendent de la voie d'exposition, de la dose absorbée, du sexe et de l'âge. L'intoxication aiguë par la TCDD cause l'apparition d'une chloracné [Bertazzi et al., 1998], d'un hirsutisme (prolifération anormale de poils chez la femme à des endroits normalement peu pileux), mais aussi une altération des nerfs périphériques avec notamment des fourmillements [Kim et al., 2003] [Michalek et al., 2001], un syndrome de cachexie (amaigrissement et fatigue), une altération de la fonction hépatique et, enfin, des nausées et des vomissements [Kimbrough et al., 1977]. Pour l'intoxication chronique, différents symptômes ont été décrits mais restent controversés. De faibles doses pendant plusieurs années pourraient entraîner des anomalies du système immunitaire, des perturbations du développement du système nerveux central, des effets xénoestrogéniques avec des troubles de la reproduction, en perturbant certaines voies de signalisation endocrines [Grassman et al., 1998]. En effet, il existe un "cross-talk" entre la voie du AhR et celle du récepteur aux œstrogènes (ER). Dans ce "cross-talk", le AhR activé par son ligand va interagir avec la voie du ER et perturber la signalisation normale par l'estradiol [Patel et al., 2007] [Matthews and Gustafsson, 2006].

L'IARC (Agence Internationale de la Recherche sur le Cancer), a classé cette molécule comme cancérogène pour l'Homme de classe 1 en 1997, c'est-à-dire qu'il existe suffisamment de preuves prouvant qu'une exposition provoque des cancers (<http://www.iarc.fr/indexfr.php>) même si cette classification a été controversée à ses débuts. A la suite des accidents industriels, comme Seveso, il a été observé une augmentation du nombre de cancers vingt ans après [Pesatori et al., 2003]. Il ne semble pas y avoir un type de cancer particulièrement augmenté pour l'exposition. Cependant, il a surtout été observé des cancers du sang (lymphomes,

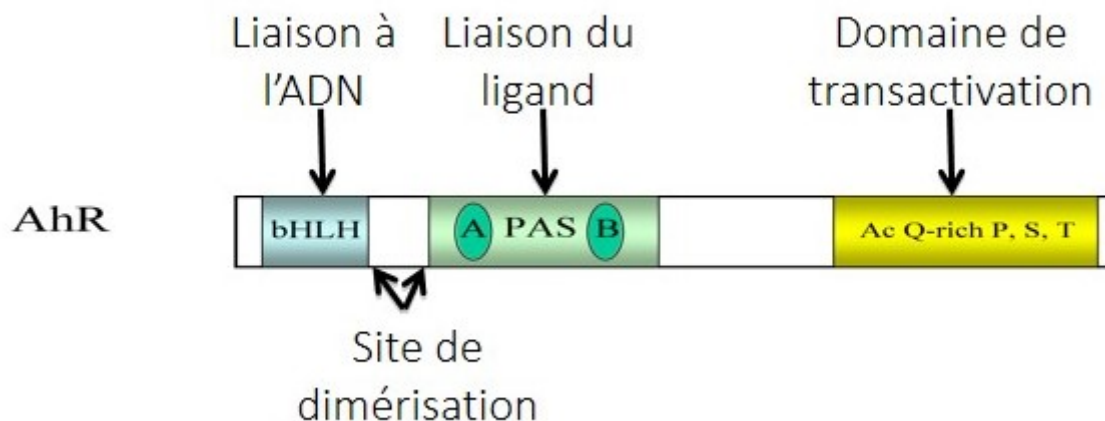


FIGURE 3 – Structure du récepteur aux aryl hydrocarbures.

Le récepteur Ah est formé de trois domaines de son extrémité NH_2 terminale à son extrémité $COOH$ terminale. Le domaine bHLH contient le domaine de liaison à l'ADN (DBD) et une partie du site de dimérisation, le domaine PAS contient le domaine de liaison au ligand (LBD) et le deuxième site de dimérisation. Le troisième site, riche en glutamines, prolines, sérines et thréonines, contient le domaine de transactivation

myélomes), des sarcomes des tissus mous, des tumeurs pulmonaires et hépatiques, des cancers du rectum chez les hommes et du tractus biliaire chez les femmes [Bertazzi et al., 1998] [Frumkin, 2003].

1.4 Voie de signalisation du récepteur aux hydrocarbures aromatiques

1.4.1 Structure, localisation et ligands du AhR

1.4.1.1 Structure du AhR

Le récepteur humain aux hydrocarbures aromatiques est une protéine constituée de 848 acides aminés avec un poids moléculaire de 106kDa. Le gène codant cette protéine est situé sur le chromosome 7. Le AhR est un facteur de transcription qui appartient à la famille bHLH-PAS (« Basic Helix Loop Helix Per-ARNT-Sim »). Les membres de cette famille présentent trois domaines principaux (figure n°3) :

- Le domaine bHLH ("basic Helix Loop Helix") est situé en N-terminal et contient 85 acides aminés. Il possède une séquence NES ("Nuclear Exportation Signal") et une

séquence NLS (« Nuclear Localisation Signal ») qui lui permet d'entrer dans le noyau. Dans le noyau, il pourra ensuite se lier à l'ADN grâce à un domaine basique DBD (« DNA Binding Domain ») au niveau de la séquence consensus 5'-TNGCGTG-3' du XRE (« Xenobiotic Responsive Element »), présente dans les promoteurs des gènes cibles. Le motif HLH permet la liaison aux protéines chaperonnes comme Hsp90 ainsi que l'hétérodimérisation avec la protéine ARNT (« AhR Nuclear Translocator », aussi appelé HIF-1*beta* pour « hypoxia inducible factor »), un autre membre de la famille bHLH-PAS, qui reconnaît la séquence GTG du XRE.

- Le domaine PAS ("Per-ARNT-Sim") est composé de deux séquences imparfaitement répétées de 50 acides aminés, PAS-A et PAS-B. PAS-A permet l'hétérodimérisation du AhR avec l'ARNT et la liaison de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN. PAS-B permet également l'hétérodimérisation avec ARNT mais aussi la liaison au ligand grâce au LBD (« Ligand Binding Domain ») [Dolwick et al., 1993] [Fukunaga et al., 1995] [Abel and Haarmann-Stemann, 2010].
- Le dernier domaine en C-terminal, est le domaine de transactivation riche en glutamines, prolines, sérines et thréonines.

1.4.1.2 Localisations et ligands du AhR

Le AhR, principalement cytoplasmique à l'état non actif, présente une expression ubiquiste variable ; il est surtout exprimé dans le poumon et le placenta et est moins exprimé dans le rein, le cerveau, le muscle squelettique et le foie [Hayashi et al., 1994].

Les dioxines (dont la TCDD), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (dont le benzo(a)pyrène) et certains PCB "dioxine-like" (polychlorobiphényles) sont des contaminants environnementaux connus pour être des ligands du AhR [Hestermann et al., 2000]. D'autres xénobiotiques possédant une activité agoniste plus faible ont été identifiés (rétinoïdes de synthèse, oméprazole) [Heath-Pagliuso et al., 1998]. Des ligands endogènes de ce récepteur ont récemment été identifiés. Le premier ligand à avoir été découvert est le 2-(1'H-indole-3'-carbonyl)-thiazole-4-carboxylic acid methyl ester (ITE) initialement isolé du poumon [Song et al., 2002]). Les autres ligands endogènes sont des dérivés du tryptophane, il y a le 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FIZC) découvert en 2005 [Oberg et al., 2005], puis, plus récemment, la cynurénine, produite par le foie, par certains tissus au cours de l'inflammation et par certaines tumeurs

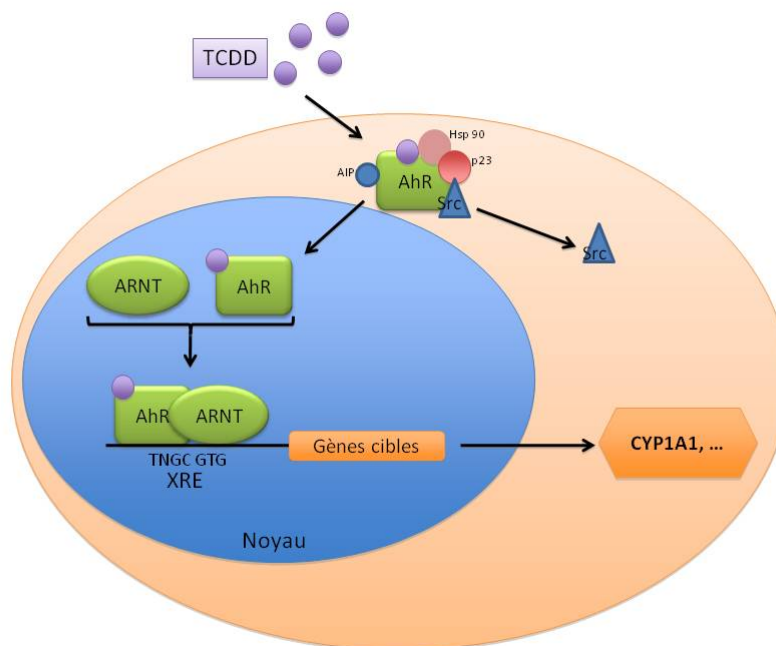


FIGURE 4 – Schéma de la voie de signalisation du AhR.

Le ligand entre dans la cellule et se lie au AhR. Le AhR change de conformation et se dissocie de la protéine kinase Src (qui sera activée) puis, dans le noyau, de ses protéines chaperonnes. Le AhR se dimérise avec l'ARNT. Le dimère se lie au XRE pour activer la transcription des gènes cibles [Pierre et al., 2011].

[Opitz et al., 2011] [Platten et al., 2012] en 2011. Le dernier ligand endogène qui a été découvert est l'acide cinnabarinique [Lowe et al., 2014]. Certains de ces ligands sont très affins pour le AhR comme le FICZ, qui a une affinité de 10^{-12}M .

1.4.2 Mode d'action

A l'état basal, le AhR est lié à des protéines chaperonnes deux Hsp90, p23 et AIP, mais aussi à la protéine Src. La TCDD, molécule hydrophobe, diffuse dans la membrane plasmique. Une fois dans le cytoplasme, elle se fixe au AhR et induit des changements de conformation et la libération de Src, démasquant ainsi le NLS ("Nuclear Localisation Signal"). La protéine kinase Src libérée du AhR est activée et va avoir des effets indépendants du XRE ; par exemple, elle pourra activer le récepteur de l'EGF (EGFR) et donc augmenter la prolifération cellulaire [Perdew, 2008] [Xie et al., 2012] [Tomkiewicz et al., 2013]. Le complexe AhR-TCDD est alors transloqué dans le noyau où il se dissocie de ses protéines chaperonnes et forme un hétérodimère avec l'ARNT. L'hétérodimère se lie à l'ADN sur les séquences consensus XRE. Parmi les gènes

activés par la voie du AhR, il y a les EMX (enzymes du métabolisme des xénobiotiques), en particulier les cytochromes P450 (CYP) 1A1, 1A2, 1B1 mais aussi d'autres gènes identifiés par des études transcriptomiques comme AGR2 (Anterior Gradient 2) [Ambolet-Camoit et al., 2010] ou SOS1 [Pierre et al., 2011] (figure n°4). Ensuite le AhR est ubiquitinilé, il retourne dans le cytoplasme et est dégradé par le protéasome [Abel and Haarmann-Stemmann, 2010].

1.4.3 Rôles du AhR

Pendant longtemps, le AhR a été décrit comme un xénosenseur et aucun rôle autre que son implication dans la détoxification des xénobiotiques n'avait été démontré. Diverses études ont suggéré qu'il pouvait avoir un rôle endogène. Cependant, celui-ci reste est encore mal défini. L'utilisation de modèles animaux autres que les mammifères (*Drosophila*, *C. Elegans*) ont montré que l'orthologue du AhR chez ces espèces n'est pas capable de lier les ligands de type dioxine mais que leur absence entraîne des phénomènes comme des malformations au niveau neuronal [Huang et al., 2004] [Kim et al., 2006]. Chez les mammifères, l'utilisation de souris knock out (KO) a mis en évidence l'importance physiologique du AhR. Des expériences *in vivo* ont montré que des souris KO pour le AhR présentaient de nombreuses caractéristiques telles que : des lésions au niveau du système cardio-vasculaire (hypertrophie cardiaque), des problèmes de développement hépatique (plus petit, le foie présente une fibrose et une accumulation de lipides) et une altération du système immunitaire et de la peau. Ces souris présentent des difficultés à maintenir la gestation, le nombre de petits par portée est réduit, ainsi que la survie pendant la lactation et le sevrage. De plus, les petits ont des retards de croissance dans les quatre premières semaines de vie [Fernandez-Salguero et al., 1995] [Barouki et al., 2007]. Il a récemment été montré que le AhR était impliqué dans le développement du système nerveux central et particulièrement au niveau du système visuo-moteur [Chevallier et al., 2013].

In vitro, il a été montré que le AhR est impliqué dans des mécanismes d'activation ou de prolifération cellulaire dépendants du phénotype de la cellule. Ce récepteur joue aussi un rôle dans l'adhésion, la plasticité et la mobilité des cellules [Barouki et al., 2007] [Tomkiewicz et al., 2013].

Chez l'Homme, le AhR est connu pour son rôle dans la régulation de l'expression des EMX. Il a aussi la particularité de pouvoir interagir avec d'autres voies de signalisation comme la voie du récepteur aux œstrogènes (ER) comme cela sera décrit au chapitre 3.3 [Safe and Wormke, 2003], du récepteur CAR (Constitutive Androstane Receptor) [Patel et al., 2007] ou avec le facteur

de transcription NF κ B [[Vogel and Matsumura, 2009](#)].

Chapitre 2

L' α -endosulfan

2.1 Les origines et propriétés physico-chimiques

L'endosulfan (6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5, 5a, 6, 9, 9a-hexahydro- 6, 9-méthano-2, 4, 3-benzo dioxathiépine -3-oxyde) est un insecticide organochloré (figure 5). Il se présente sous la forme de deux isomères, représentés dans des proportions différentes dans la forme commerciale, l'isomère alpha étant présent à hauteur de 70% et l'isomère bêta à hauteur de 30%, en plus d'impuretés et de produits de dégradation. L' α -endosulfan est plus toxique que l'isomère bêta, et sa demi-vie dans le sol est d'environ 35 jours. Sa dose journalière admissible est de $6 \mu\text{g kg}^{-1}$ de poids corporel.

Ce pesticide a été très utilisé à partir des années 1950 pour les cultures alimentaires (thé, café, cultures légumières, etc.). Il a aussi été utilisé comme agent de conservation du bois et comme anti-termite. Il agit par contact et par ingestion sur une grande variété d'insectes et d'acariens. Il a été calculé qu'en 2005, la production annuelle mondiale d'endosulfan s'élevait à 12 800 tonnes [Li and Macdonald, 2005], l'Inde étant le plus gros producteur avec une production de 5 400 tonnes à elle seule [Ayres and Ayres, 1996]. Entre les années 1950 et 2000, il est estimé qu'il a été utilisé 308 000 tonnes d'endosulfan pour l'agriculture [Li and Macdonald, 2005]. L'endosulfan, de poids moléculaire de 406.9 g/mol, est très lipophile et donc peu soluble dans l'eau. Ses vapeurs sont stables dans l'atmosphère, ce qui lui permet de se propager par voie aérienne. De ce fait, il fut l'un des pesticides organochlorés les plus abondants détectés dans l'air aux Etats-Unis [Shen et al., 2005]. L'endosulfan est retrouvé dans de nombreux écosystèmes à distance des zones où il a été utilisé, dans toutes les ressources d'eaux (eaux de surfaces,

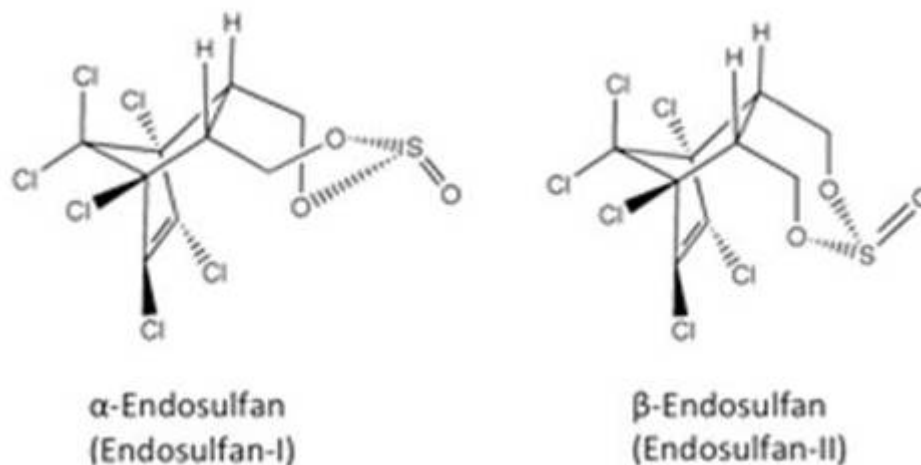


FIGURE 5 – Structure chimique de l' α -endosulfan et du β -endosulfan

(<http://www.isotope.com/corporate-overview/newsletters.cfm?nid=The:%20Standard%20August%202011&aid=Endosulfans%20added%20to%20Stockholm%20Convention%20POPs>)

précipitations ou glace), dans l'air et dans les sols. De plus, la faune en Arctique présente des concentrations non négligeables de ce pesticide bien qu'il n'y ait jamais été utilisé. Des résidus de ce polluant ont aussi été retrouvés dans l'air intérieur d'habitations, dans les sédiments, les sols, les écorces d'arbres, la faune et la flore aquatique (http://www.pan-germany.org/download/introduction_progressive_alternatives_a_endosulfan.pdf). Son utilisation a été interdite dans de nombreux pays européens, dont la France en 2006 (retrait de la mise sur le marché de tous les produits contenant de l'endosulfan à partir du 1er juin 2006). Cependant, l'utilisation des stocks était autorisée jusqu'en décembre 2007. Certains pays en voie de développement continuent à l'utiliser, comme l'Inde et la Chine. Il a été récemment inscrit (mai 2011) par la convention de Stockholm comme POP pour une suppression progressive entre 2012 et 2023.

L'endosulfan est assez résistant aux facteurs de dégradations physico-chimiques et biologiques, mais il peut être métabolisé par des micro-organismes, comme des champignons et des bactéries, qui se trouvent dans le sol. Le pesticide peut être oxydé en sulfate d'endosulfan ou hydrolysé en endosulfan diol [Goebel et al., 1982]. L'endosulfan et ses métabolites sont très présents dans les sols. Il a été montré qu'ils avaient une demi-vie de neuf mois à six ans dans les sols. Le taux de dégradation dépend fortement des conditions du sol, comme par exemple le contenu en eau, le pH ou la température. Tout comme dans les ressources d'eau, plus la température sera froide à de hautes latitudes, plus la demi-vie sera grande. Le métabolite sulfate d'endosulfan

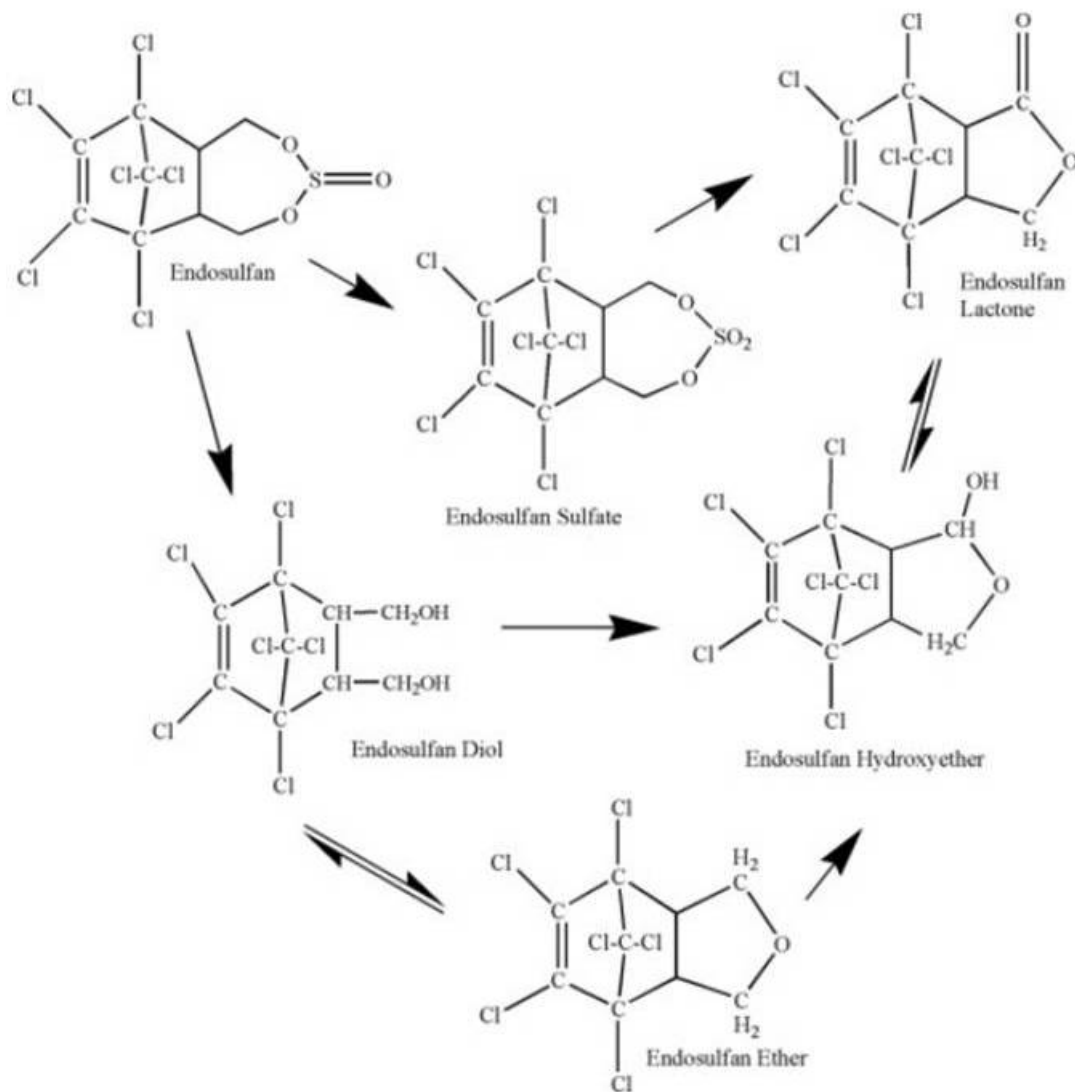


FIGURE 6 – Structure chimique des métabolites de l'endosulfan
[Silva and Beauvais, 2010]

présente un risque aussi élevé pour la santé que le pesticide, et est plus difficilement dégradé [Kataoka and Takagi, 2013] [Weber et al., 2010]. (figure n°6).

2.2 Les voies d'exposition

Les voies d'exposition à l'endosulfan sont la voie orale par ingestion de nourriture contaminée (poissons, légumes) pour la population générale, la voie pulmonaire surtout pour les professionnels et enfin la voie cutanée car l'endosulfan est liposoluble. Il est hautement toxique et peut être mortel pour toutes les voies d'exposition. Chez l'Homme, une fois que l' α -endosulfan

est entré dans l'organisme, il est rapidement distribué dans le tissu adipeux et le cerveau et, en moindre quantité, dans le rein et dans le foie. Ensuite, il sera métabolisé en composé sulfate par les CYP 3A4 et 3A5; le CYP 2B6 ne métabolisera que l'isomère alpha avec une vitesse de métabolisation et une clairance plus rapide que les autres CYP [Casabar et al., 2006] [Lee et al., 2006b]. Les métabolites de l'isomère bêta sont moins toxiques et sont formés plus rapidement que ceux de l'isomère alpha. Mais le β -endosulfan peut se transformer irréversiblement en isomère alpha. Chez l'Homme, la demi-vie de l' α -endosulfan est d'environ quelques heures à 7 jours avec une excrétion urinaire (ATSDR, 2000-Endosulfan, <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=609&tid=113>). Il peut se lier à différents récepteurs dans de nombreux tissus. Il est capable d'activer le "pregnane X receptor" (PXR) [Coumoul et al., 2001] [Casabar et al., 2006]. De plus, il peut aussi activer la voie du ER, ce qui entraîne des effets xénoœstrogéniques [Briz et al., 2011].

2.3 Les effets de l'endosulfan

L'endosulfan est un antagoniste des neurotransmetteurs GABA (acide gamma- aminobutyrique). Il inactive les canaux chlorure, entraînant une hyperpolarisation des neurones et une excitation incontrôlée des neurones de l'insecte, d'où son utilisation comme insecticide [Kaushik and Kaushik, 2007]. Il agit directement après exposition par contact, ingestion ou inhalation.

2.3.1 Chez les animaux

Les poissons sont parmi les espèces autres que les insectes les plus sensibles et les plus exposés à ce polluant. En effet, bien que l'endosulfan ne soit pas soluble dans l'eau, il se lie aux sédiments et aux argiles des sols aquatiques, où il sera persistant pendant de nombreuses années. Il causera une neurotoxicité lors du développement embryonnaire [Stanley et al., 2009], une dégénérescence et une nécrose des intestins. La fonction hépatique est aussi altérée avec une diminution des quantités de cholestérol, d'acide gras et de glucose hépatique et sanguin [Gill et al., 1991]. Il a aussi été observé des congestions et des hémorragies hépatiques [Cengiz et al., 2001]. Des expositions répétées chez les rongeurs entraînent une altération du système immunitaire, des troubles hépatiques et rénaux. Les fonctions neurologiques et les systèmes endocriniens sont

aussi perturbés [Hack et al., 1995] [Paul et al., 1994]. Ce xénobiotique a été classé avec les substances de catégorie 2 par l'OMS, c'est-à-dire qu'il présente un «danger modéré». De plus il n'a pas été classé dans les substances mutagènes ou cancérigènes par le Centre International de Recherche sur le Cancer malgré ses effets *in vitro*.

2.3.2 Chez l'Homme

De nombreux cas d'intoxication, parfois mortels, ont été rapportés dans différents pays comme le Bénin, la Colombie, Cuba, l'Inde, l'Afrique du sud, la Turquie et les États-Unis. Dans le sud de l'Inde et en Amérique centrale, l'endosulfan représente l'une des causes principales d'intoxications aiguës (<http://www.panap.net/en/p/post/pesticides-info-database/117>). Seules les expositions accidentelles ou volontaires importantes (comme les suicides) ont permis de décrire les effets toxiques de l'endosulfan sur l'Homme. Les professionnels manipulant ce pesticide sont bien évidemment les plus à risque vis-à-vis d'une toxicité aiguë. Les premiers symptômes sont des manifestations neurologiques (épilepsie, excitation, hyperesthésie (exacerbation des perceptions sensorielles et tactiles) de la face, de la langue et des extrémités, pertes de conscience, convulsions pouvant causer la mort). Ces effets pourraient être liés à l'inhibition des récepteurs GABA par l'endosulfan, empêchant l'entrée des ions chlorure et conduisant ainsi à une trop forte stimulation du système nerveux central. En parallèle de ces premiers symptômes neurologiques, il a été observé une toxicité hépatique, une acidose métabolique, une dyspnée et des troubles gastro-intestinaux, ainsi que des œdèmes cérébraux et des atteintes cardiaques [Eyer et al., 2004] [Yavuz et al., 2007].

2.4 Voie de signalisation du Récepteur aux œstrogènes

2.4.1 Ligands, localisation et structure

2.4.1.1 Les œstrogènes et ligands exogènes des récepteurs aux œstrogènes

Les œstrogènes sont des hormones stéroïdiennes ciblant différents tissus comme les organes reproducteurs, la glande mammaire, le foie, les os, le système cardiovasculaire et le cerveau. La famille des œstrogènes naturels comporte le 17β -œstradiol (E2) qui est majoritairement représenté, l'œstrone (E1) et l'œstriol (E3). Chez la femme, ils sont synthétisés par l'ovaire,

le corps lutéal, le placenta et, en moindre quantité, par le foie, la glande mammaire et la glande surrénale. Chez l'homme, les œstrogènes proviennent de l'aromatisation des androgènes [Gooren and Toorians, 2003]. Les ligands exogènes, ou xœstrogènes, sont issus de différentes familles chimiques qui peuvent moduler les effets des œstrogènes en se liant au ER (Estrogen Receptor). Ces composés sont appelés des perturbateurs endocriniens. L'Union Européenne a défini un perturbateur endocrinien comme une substance ou un mélange exogène altérant les fonctions du système endocrinien, et induisant donc des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou sous-populations. Des substances naturelles comme les polyphénols des végétaux, aussi appelés phytoœstrogènes, peuvent également perturber la voie de signalisation des récepteurs aux œstrogènes. On les trouve dans le soja et dans les graines de lin, par exemple [Usui, 2006]. Les xœstrogènes synthétiques proviennent de l'industrie, ce sont des détergents (alkylphénols), des plastifiants (phtalates, Bisphénol A), des PCB, des pesticides. Ces composés sont faiblement dégradés, ce qui augmente leur accumulation dans l'environnement et favorise les dérégulations hormonales des animaux. Chez l'Homme, les effets des perturbateurs endocriniens sont controversés. Mais certaines études montrent qu'ils causent une diminution de la fertilité masculine et une augmentation de l'incidence des cancers hormono-dépendants [Rozati et al., 2002] [Wetherill et al., 2005].

2.4.1.2 Structure et localisation des récepteurs aux œstrogènes

Il a été identifié deux récepteurs nucléaires aux œstrogènes, l'alpha ($ER\alpha$) et le bêta ($ER\beta$). Les récepteurs aux œstrogènes sont des facteurs de transcription de 68 kDa avec 3 domaines et une région charnière. Le $ER\alpha$ humain est codé par 595 acides aminés et il est situé sur le chromosome 6, alors que le $ER\beta$ est composé de 495 acides aminés et il est situé sur le chromosome 14. Le gène du $ER\alpha$ est plus long (140 kb) que celui du $ER\beta$ (40 kb).

Ces récepteurs nucléaires comportent trois domaines majeurs et une région charnière (figure n°7) :

- le domaine N-terminal A/B contenant le domaine de transactivation AF-1. AF-1, en interagissant avec des coactivateurs, des corépresseurs ou des protéines phosphorylées, active ou inhibe la transcription des gènes cibles des œstrogènes.
- un domaine C de liaison à l'ADN (DBD) qui forme deux domaines en doigt de zinc, est divisé en deux parties. La première contenant la boîte proximale ou P-box, est très conservée entre les deux isoformes du ER, et permet la liaison à l'ADN au niveau de séquences

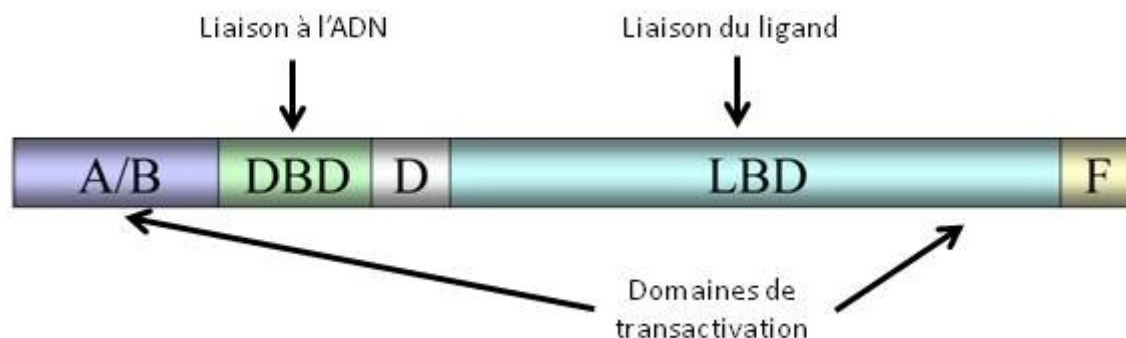


FIGURE 7 – Structure du récepteur aux œstrogènes.

Le récepteur aux œstrogènes est formé de trois domaines de l'extrémité NH_2 terminale vers l'extrémité $COOH$: A/B, domaine de transactivation indépendant de la liaison de l'hormone, le domaine C (DBD) de liaison à l'ADN, le domaine E/F de liaison du ligand (LBD) et de transactivation dépendant du ligand. La région charnière D est une zone variable du récepteur.

consensus appelées ERE ("Estrogen Responsive Element") : 5'-AGGTCA n nTGACCT-3'. La deuxième partie, la boîte distale ou D-box, est impliquée dans la dimérisation du récepteur, et est différente suivant l'isoforme.

- la région charnière appelée le domaine D, est très variable.
- le domaine C-terminal, E/F, permet la liaison au ligand grâce au LBD ("Ligand Binding Domain"). Il contient un domaine de transactivation AF-2 qui est dépendant de la fixation du ligand, un NLS et un domaine de dimérisation du récepteur. Le LBD peut être maintenu dans un état transcriptionnellement inactif, par la liaison à des protéines chaperonnes, comme Hsp90, en cas d'absence de ligand ([Nilsson et al., 2001]).

La poche du domaine de liaison au ligand étant très large, le récepteur peut lier de nombreux ligands autres que les œstrogènes. Les deux isoformes présentent des affinités variables selon les ligands.

Chez l'être humain, les récepteurs aux œstrogènes sont présents dans le cerveau, le système cardiovasculaire, le sein, le tractus uro-génital et dans l'os. Mais les isoformes α et β sont plus ou moins représentées dans certains organes. L'isoforme alpha est majoritairement présente dans l'utérus, le vagin, la glande mammaire et le foie, alors que l'isoforme beta est surtout exprimée dans l'ovaire, la prostate, le testicule, le poumon, le thymus et l'hypothalamus [Frasor et al., 2003].

2.4.2 Mode d'action

A l'état basal, le récepteur est situé majoritairement dans le noyau, il est inactif et sous forme de monomère, lié aux protéines chaperonnes, comme Hsp90, libérées après liaison du ligand au récepteur. Cependant il existe aussi une localisation trans-membranaire du ER. En effet, le ER peut subir une S palmitoylation catalysée par la Palmitoyl Acyl Transférase (PAT). Le complexe ER-palmitoyl pourra se lier à des protéines spécifiques de la membrane, comme la cavéoline 1, ce qui permet la localisation transmembranaire de ce récepteur [Marino et al., 2006]. Les récepteurs aux œstrogènes agissent grâce à plusieurs voies de signalisation (figure n°8) :

- la voie de signalisation « classique » ou la transcription dépendante des ligands (n°1) : les œstrogènes se lient aux récepteurs, induisant un changement de conformation qui découvre le domaine AF-2. Les récepteurs forment des homodimères grâce au domaine C (les récepteurs alpha et bêta peuvent aussi former des hétérodimères). Le dimère se lie aux séquences ERE (« estrogen responsive element ») des promoteurs des gènes cibles et induit leur transcription [Tora et al., 1989].
- la voie d'activation ERE-indépendante (n°2) : les ER interagissent avec d'autres facteurs de transcription, comme c-jun [Jakacka et al., 2001], et ainsi, stabilisent leur liaison à l'ADN. Cette voie permet l'activation de la transcription de gènes ne contenant pas de séquence ERE.
- la voie non génomique (n°3) : une fois le ER trans-membranaire activé par son ligand, il entraîne une cascade de signalisation par l'intermédiaire de seconds messagers comme l'AMPC (adénosine monophosphate cyclique) [Razandi et al., 1999]. Cette voie ne requiert pas d'activité transcriptionnelle.
- la transcription indépendante des ligands (n°4) : des facteurs de croissance, comme l'EGF (« Epidermal Growth Factor »), activent les récepteurs aux œstrogènes. En effet, ces facteurs activent la voie des MAPK (« Mitogen-Activated Protein Kinase ») qui entraîne la phosphorylation des sérines dans le domaine AF-1 de ER, comme la sérine 118, ce qui active le récepteur [Bunone et al., 1996]. Le ER est activé et se lie au ERE.

2.4.3 Rôle du ER

Des souris KO pour chaque ER ont permis de déterminer le rôle des deux isoformes. Ces souris présentent des malformations des organes sexuels et des problèmes de fertilité. Chez la

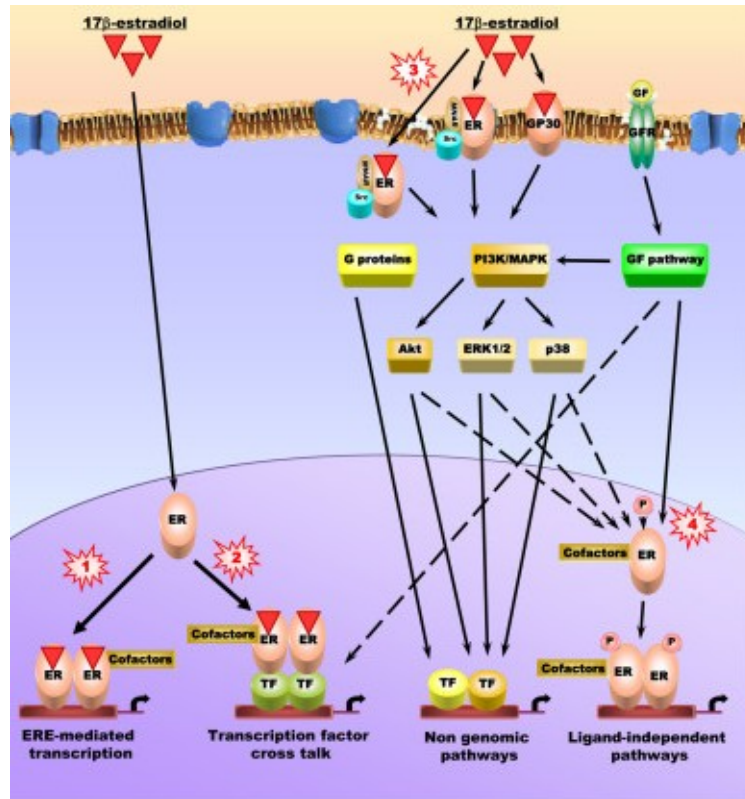


FIGURE 8 – Schéma des différentes voies d'activation du récepteur aux œstrogènes [Roman-Blas et al., 2009]

Le ER peut avoir des voies de signalisation différentes :

- 1 : voie génomique directe : le ligand se fixe au ER qui se dimérise et se fixe au ERE des gènes cibles.
- 2 : voie de transcription indépendante des ERE : le ER forme un complexe avec d'autres facteurs de transcription et se fixe aux éléments de réponse de ces facteurs de transcription.
- 3 : voie non génomique : le ER est membranaire ; une fois activé par son ligand, il induit une cascade de signalisation intracellulaire grâce à des seconds messagers.
- 4 : voie de transcription indépendante des ligands : le ER peut être phosphorylé (par exemple par la voie d'activation du EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)). Cette phosphorylation l'active, lui permettant de se lier au ERE.

femelle, l'absence de ER α provoque une stérilité, une perturbation de la croissance de l'utérus et des glandes mammaires, une absence d'ovulation et une insensibilité aux œstrogènes. L'invalidation de ER β entraîne une diminution de la fécondité. Chez le mâle, l'invalidation de ER α ou des deux ER cause des troubles de la spermatogénèse, une atrophie testiculaire, un taux élevé de testostérone dans le sérum et une stérilité. Ces souris présentent un comportement moins agressif par rapport aux souris sauvages. En revanche, les souris KO pour le ER β sont plus agressives et ont une quantité plus élevée de spermatogonies, bien que leur fertilité soit identique à celle des souris sauvages [Couse and Korach, 1999].

Les effets du ER α sont aussi associés au métabolisme glucidique. Chez l'Homme, une diminution du ER α entraîne une augmentation de l'obésité. Les désordres métaboliques induits par un ER α muté sont ceux décrits dans le syndrome métabolique [Mauvais-Jarvis et al., 2013]. De plus, des souris KO pour le ER α présentent une intolérance au glucose, une résistance à l'insuline, une obésité, de l'inflammation. Tous ces symptômes vont aussi dans le sens d'un syndrome métabolique. Il a été montré que les œstrogènes régulaient la prise alimentaire, le poids corporel, l'homéostasie du glucose, la sensibilité à l'insuline, la distribution de la masse adipeuse, la lipolyse et la lipogénèse (figure 9)[Clegg, 2012][Mauvais-Jarvis et al., 2013].

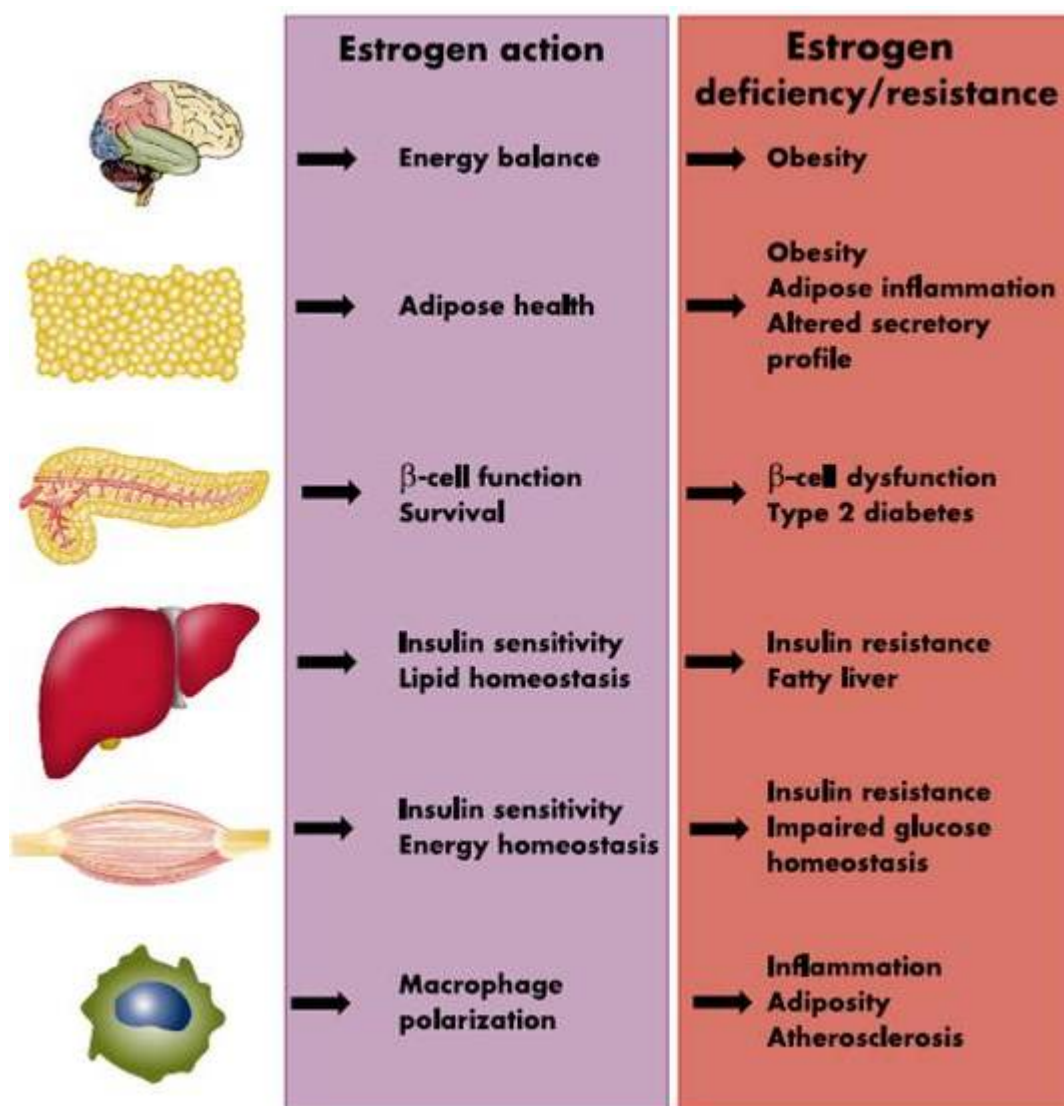


FIGURE 9 – Récapitulatif de l'action des œstrogènes dans l'homéostasie du glucose et le métabolisme énergétique, dans un contexte "physiologique normale" (panneau de gauche) et au cours de la ménopause (panneau de droite).

Schéma représentant les rôles principaux des œstrogènes dans des conditions "physiologiques normales" et au cours de la ménopause, c'est-à-dire l'arrêt définitif de la fonction ovarienne et donc de la production d'hormones comme les œstrogènes [Mauvais-Jarvis et al., 2013].

Chapitre 3

Les mélanges

3.1 La problématique des mélanges

Tout au long de sa vie, l'être humain est exposé à toutes sortes de produits chimiques en mélanges. Ces expositions se font par des voies différentes et inévitables, comme la voie aérienne, avec la pollution de l'air inspiré, par la voie alimentaire, avec l'ingestion de denrées contenant des molécules bio-accumulées au cours de la chaîne alimentaire ou même par voie cutanée pour les produits cosmétiques par exemple. L'étude de l'effet des mélanges est donc indispensable si l'on veut protéger au mieux l'Homme et les écosystèmes, d'autant plus que ces mélanges sont mal connus, voire inconnus, en qualité et en quantité. Cependant, la majeure partie des études de toxicologies ne s'intéresse qu'aux effets d'une seule molécule, et, qui plus est, à des concentrations souvent trop élevées pour pouvoir se rapprocher de la réalité des expositions. En effet, les fiches de données de sécurité ne concernent qu'un seul produit et n'abordent pas le problème des mélanges. Les scientifiques ont commencé à s'inquiéter des effets des mélanges au début des années 1900, avec les travaux de Loewe et Muischnek (1926) dans lesquels ces auteurs avancent la notion d'addition de concentration, suivi de Bliss qui a identifié les trois modèles de base d'action commune ou d'interaction de la combinaison des produits chimiques, qui seront détaillés dans le paragraphe suivant. En 1986, l'agence américaine EPA (Environmental Protection Agency) a publié les "Guidelines for the Health Risk Assessment of Chemical Mixtures". Ce guide de procédures a pour but d'évaluer les données sur les risques sanitaires dûs à une exposition à des molécules chimiques en mélange. L'accent est mis sur les doses réponses et sur la caractérisation du risque.

Plus récemment, l'EFSA (autorité européenne de sécurité des aliments) a défini l'évaluation de l'exposition combinée à des substances chimiques multiples comme sa priorité <http://www.efsa.europa.eu/fr/press/news/130712a.htm>.

3.2 Concept de base

En 1936, Bliss a posé les bases théoriques des interactions. Il a classé les interactions en trois catégories (figure 10) [Bliss, 1939] [Ribera and Taberly, 2011] :

- L'addition de réponses ou d'effets, aussi appelé "Independent joint action" ou "Bliss independence". Dans cette première catégorie, chaque molécule agit indépendamment et différemment. La toxicité du mélange peut donc être prédite par la toxicité individuelle de chaque molécule. Il n'y a pas d'influence des molécules du mélange entre elles. Ces expositions sont les plus courantes. En utilisant cette méthode de prédiction, les estimations seront plus précises mais sous-estimées, les scientifiques préfèrent donc utiliser le modèle suivant pour prédire la toxicité d'un mélange.
- L'addition dose/concentration, "Similar joint action" ou "Loewe additivity". Les molécules agissent indépendamment mais de la même manière. Comme précédemment, il n'y a pas d'influence des molécules du mélange entre elles. Un mélange contenant des molécules à une dose inférieure à leur NOAEL ("No Observed Adverse Effect Level") respectives, mais dont les molécules utilisent la même voie de signalisation, auront un effet toxique, puisque la somme des doses de chaque molécule sera supérieure à la NOAEL. Ce modèle permet une meilleure prédiction de la toxicité d'un mélange, même s'il a tendance à surestimer le risque. C'est d'ailleurs celui qui est utilisé pour définir le TEF dans le cas des dioxines, afin de déterminer la toxicité de molécules combinées d'isomères ou d'analogues structuraux comme les PCB "dioxine-like" et les dioxines.
- Les effets complexes ou "synergistic action". Ce dernier type d'action synergique, se caractérise par une toxicité plus importante du mélange, par rapport à la toxicité prédite par l'addition de celles des molécules seules. A l'inverse, des molécules différentes peuvent avoir des effets opposés (ou antagonistes) et donc la résultante sera un effet final inférieur par rapport au résultat attendu sur la base de l'additivité simple. Dans certains cas, on peut obtenir une annulation des effets. Cette catégorie est la plus rarement rencontrée.

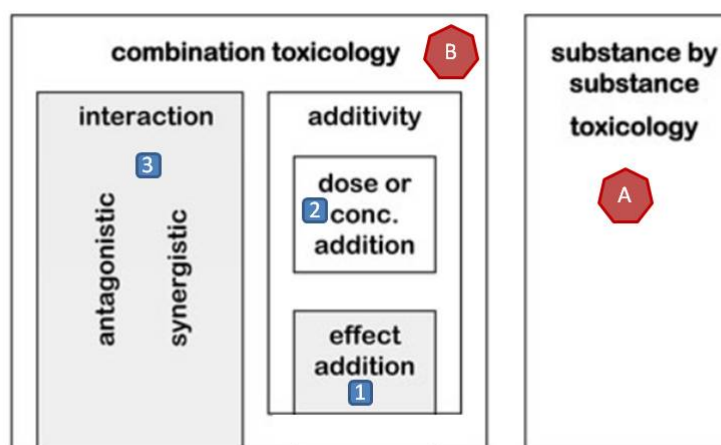


FIGURE 10 – Schéma des méthodes d'évaluation des risques de mélanges de polluants.

Les évaluations substance par substance ne considèrent qu'une petite partie de la toxicité environnementale (A). Trois méthodes ont été définies pour évaluer la toxicité des mélanges (B), qui représente une plus grande partie de la toxicologie environnementale :

- 1- l'addition de réponse ou des effets
- 2- l'addition dose/ concentration
- 3- les effets complexes

[Sarigiannis and Hansen, 2012]

Cette méthode d'évaluation exclut certains mélanges, comme les mélanges composés de molécules interagissant par différentes voies. Ces différentes voies activées peuvent interagir ensemble et agir sur des cibles communes. En réalité, les scientifiques doivent utiliser ces différents concepts en même temps, car l'exposition aux mélanges se fait par de nombreux polluants qui ont des modes d'actions et des cibles différentes.

Il existe aussi une classification suivant le nombre de molécules composant le mélange. Quand le mélange est composé de moins de 10 molécules, il est défini comme un "mélange simple". Dans ce cas, les compositions qualitatives et quantitatives sont connues. Les "mélanges complexes" sont, quant à eux, définis comme composés de plusieurs dizaines, centaines ou milliers de molécules, dont la quantité et la qualité ne sont pas complètement connues [Groten, 2000].

Plus récemment, les scientifiques ont essayé de mettre au point des techniques d'évaluation des risques, à l'instar du TEF utilisé pour les agonistes du AhR, comme par exemple le modèle

QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship). Ce modèle a pour but de prédire, *in silico*, les effets de molécules sur l'organisme, grâce à un algorithme utilisant toutes les données de la littérature, en corrélant la structure chimique à l'effet biologique.

Pour l'évaluation des risques des mélanges de perturbateurs endocriniens, par exemple, une approche similaire au TEF est impossible car les courbes doses réponses de certains perturbateurs endocriniens ne sont pas monotones, et, dans la réalité biologique, il existe de nombreuses interactions possibles. Il a donc été proposé de regrouper les perturbateurs endocriniens selon leurs capacités à induire des effets similaires et non pas par leurs mécanismes d'action communs ([Kortenkamp, 2007]).

La dose est aussi un paramètre important à prendre en considération. La définition de "faible dose" est aussi discutée. Une dose faible peut être considérée comme étant [Kortenkamp, 2007] :

- une dose plus faible que celle utilisée dans les tests de toxicologie
- une dose proche ou égale de celle rencontrée par l'Homme
- une dose associée à de faibles effets.

Pour étudier les effets des mélanges, il est souvent choisi des doses avec peu d'effets, proches de la NOEL (No Observed Effect Level), mais ces doses sont souvent encore trop élevées par rapport à l'exposition réelle de l'Homme [Kortenkamp, 2007]. Il faut aussi prendre en compte le fait que l'exposition de l'Homme a lieu tout au long de sa vie et que les tests réalisés sur des modèles de culture cellulaire et même des exposition *in vivo* chez l'animal correspondent rarement à ce cas de figure, bien que certaines expositions sur de grande partie de la vie soit possible chez les rongeurs.

3.3 Le "crosstalk" AhR/ER

Le mélange TCDD plus α -endosulfan que nous utilisons a la particularité d'activer des voies différentes. La TCDD est connue pour activer la voie du AhR, et l' α -endosulfan active plusieurs voies de signalisation, notamment, la voie du ER. Il a été prouvé l'existence d'un "crosstalk" entre le AhR et le ER, c'est-à-dire que le AhR peut interagir avec la voie du ER .

Le ER α a un rôle positif sur la signalisation du AhR, en permettant l'activation de la transcription dépendante du AhR du CYP1A1 par exemple, alors que le AhR activé inhibe l'activité du ER par différents mécanismes. Les mécanismes moléculaires du "crosstalk" AhR/ER peuvent être une combinaison de différents mécanismes (figure n°11) [Matthews and Gustafsson, 2006]

[[Nilsson et al., 2001](#)] :

- 1 : le AhR activé entraîne l'augmentation de la quantité de certaines enzymes, comme les cytochromes CYP1A1 et 1B1 ou l'aromatase. Ces enzymes vont métaboliser les œstrogènes et donc modifier leur concentration dans l'organisme.
- 2 : le complexe AhR/ARNT peut se lier à des iXRE ("inhibitory Xenobiotic Responsive Element") situés à proximité des ERE, empêchant la transcription des gènes cibles du ER, même si ce dernier est fixé à son élément de réponse.
- 3 : le AhR peut diminuer la quantité du ER et induire ainsi sa dégradation, en le dirigeant vers le protéasome en entraînant son ubiquitinylation, ou en formant un complexe AhR/ARNT/ER qui sera ubiquitinylé [[Wormke et al., 2003](#)].
- 4 : l'activation du AhR pourrait entraîner la synthèse de protéines inhibitrices encore inconnues.
- 5 : un phénomène de compétition pour des co-facteurs identiques entre le complexe AhR/ARNT et l'homodimère ER a été décrit.

Enfin, en absence d'œstrogènes, le AhR lié à la TCDD peut recruter le ER α par une interaction directe protéine-protéine [[Matthews and Gustafsson, 2006](#)].

Ce "crosstalk" démontre bien la difficulté de l'étude des mélanges, car l'activation d'une voie entraînera potentiellement la perturbation d'une autre voie de signalisation, d'une manière encore mal connue.

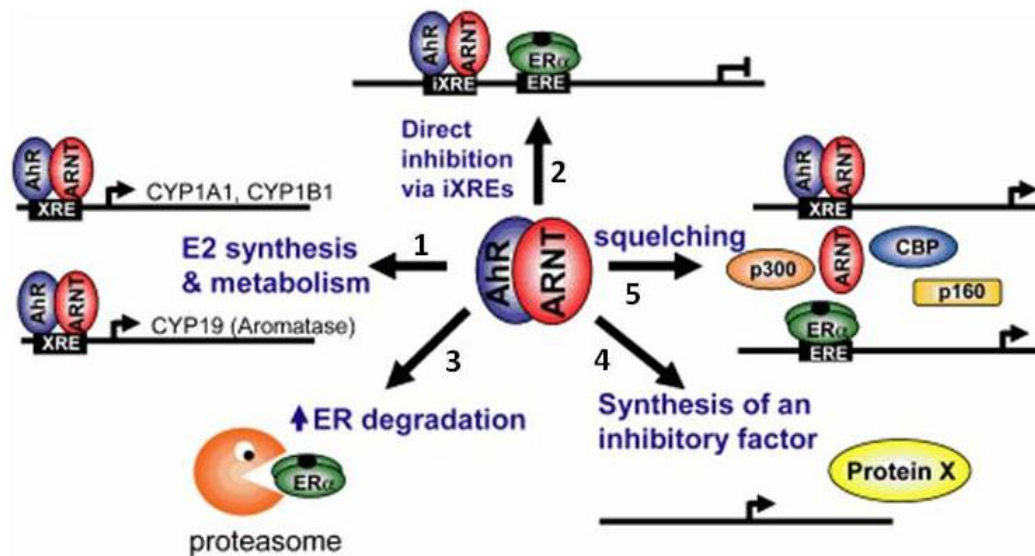


FIGURE 11 – "Crosstalk" entre la voie du AhR et du ER.

Le AhR peut perturber la voie du ER :

- en induisant la synthèse d'enzymes, comme les cytochrome P450, qui métabolisent l'œstradiol
- en inhibant la transcription des gènes cibles du ER en se liant à des inhibiteurs (iXRE)
- en utilisant les mêmes co-facteurs (compétition)
- en synthétisant des protéines inhibitrices
- en dégradant le ER

[Matthews and Gustafsson, 2006]

Chapitre 4

Polluants organiques persistants et métabolisme glucidique et lipidique

4.1 Métabolisme glucidique

Chez l'Homme, le foie est un organe volumineux, divisé en quatre lobes, pesant 1,5kg chez l'adulte. Il est la plus grande glande de l'organisme. C'est aussi l'organe qui compte le plus de vaisseaux sanguins. Un litre et demi de sang le traverse par minute, lui donnant une couleur rouge brunâtre, ce qui fait qu'il contient 10% du volume sanguin du corps. Le sang arrive au foie par l'artère hépatique et par la veine porte. Cette dernière amène le sang contenant toutes les substances absorbées dans l'intestin afin qu'elles soient dirigées vers le foie. L'artère hépatique amène du sang chargé en oxygène pour oxygéner le foie. Le sang ressort du foie par trois veines sus-hépatiques qui se jettent dans la veine cave inférieure <http://www.amfe.fr/maladies/description-du-foie/>.

Les hépatocytes représentent 85% des cellules du foie. Les autres cellules sont les cellules des canaux biliaires, les cellules endothéliales, les cellules de Kupffer (macrophages hépatiques) et les cellules stellaires. Ces dernières peuvent stocker et métaboliser la vitamine A et pourront stocker les lipides. Au cours d'un phénomène inflammatoire, elles synthétisent de la matrice extracellulaire. De toutes ces cellules, seuls les hépatocytes possèdent l'équipement enzymatique permettant un métabolisme énergétique complet, comprenant, entre autre, le métabolisme des glucides, des lipides et le cycle de Krebs et de l'urée.

Le foie est le seul organe qui puisse réguler finement la glycémie de tout l'organisme, qui

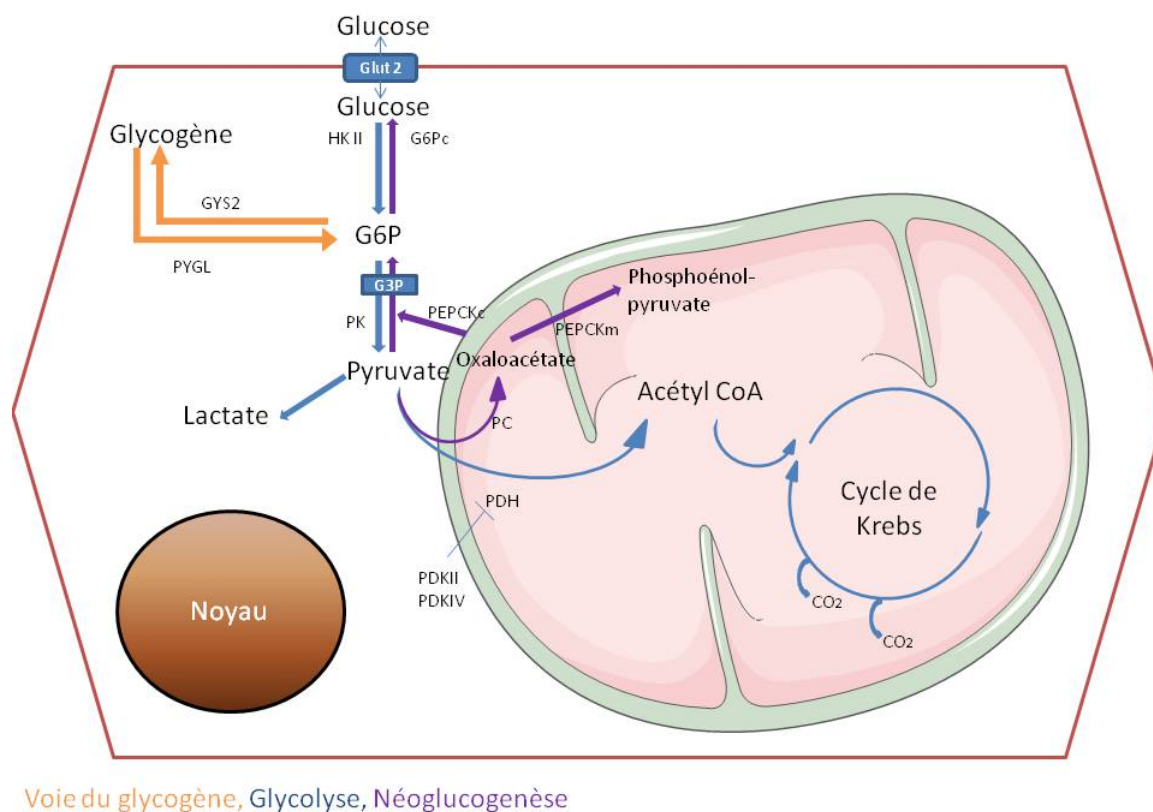


FIGURE 12 – Schéma récapitulatif et simplifié du métabolisme glucidique dans l'hépatocyte. Trois voies sont représentées :

- la glycolyse, avec des enzymes comme l'hexokinase 2 (HK 2), la pyruvate kinase (PK), la pyruvate déshydrogénase (PDH), les pyruvate déshydrogénase kinases 2 et 4 (PDK).
- la voie du glycogène, avec la glycogène synthase (GYS) et la glycogène phosphorylase (PYGL).
- la néoglucogenèse avec la pyruvate carboxylase (PC), le phosphoénol pyruvate carboxykinase cytosolique et mitochondriale (PEPCk et PEPCkm), la glucose 6 phosphatase sous-unité catalytique (G6Pc).

doit être maintenu autour d'1 g/L. Pour cela, il a la capacité de capter le glucose sanguin qui est en excès, après un repas par exemple, de le stocker (sous forme de glycogène), ou de le transformer en énergie (en ATP) en utilisant le cycle de Krebs. A l'inverse, en cas de jeûne, il n'y a pas assez de glucose dans le sang, le foie va donc synthétiser du glucose *de novo* en utilisant la voie de la néoglucogenèse (figure n°12).

4.1.1 La glycolyse

La glycolyse est composée de deux phases :

- la phase préparatoire : elle consiste en la production de deux molécules de glycéraldéhyde-

3-phosphate (G3P) à partir d'une molécule de glucose. Elle utilise alors deux molécules d'ATP (Adénosine TriPhosphate).

- la phase de production d'énergie : une molécule de G3P sera transformée en une molécule de pyruvate, en produisant une molécule de $NADH/H^+$ et deux d'ATP.

Dans la phase préparatoire, le glucose sanguin, provenant de l'alimentation, entre dans les cellules hépatiques via le transporteur bidirectionnel de glucose, GLUT 2 (SLC2A2). L'entrée du glucose dans les hépatocytes se fait de manière passive grâce à un gradient de concentration. Dans la cellule, le glucose est transformé en glucose-6-phosphate (G6P) par l'hexokinase, ce qui permet de bloquer le glucose dans la cellule, et de déplacer le gradient pour faire entrer le glucose sanguin. Le G6P est transformé par la glucose-6-phosphate-isomérase en fructose-6-phosphate. Ce dernier est ensuite métabolisé en fructose-1,6-bisphosphate par la phosphofructokinase 1 qui est l'enzyme limitante et la plus régulée de cette voie. La molécule formée sera ensuite divisée en deux molécules de G3P.

Ensuite commence la phase de production d'énergie. Les deux G3P produits à partir d'une molécule de glucose sont métabolisés de la même manière. La première réaction enzymatique, catalysée par la G3P déshydrogénase, va synthétiser une molécule intermédiaire de la glycolyse et réduire une molécule de NAD^+ en une molécule de $NADH/H^+$. L'enzyme suivante (la phosphoglycérate kinase) ainsi que la dernière enzyme (la pyruvate kinase, qui catalyse une réaction irréversible) vont chacune entraîner la production d'un ATP, avec la synthèse de pyruvate.

Des hormones vont pouvoir moduler cette voie selon le statut "nourri" ou "à jeun" de l'organisme. L'adrénaline et le glucagon vont freiner la glycolyse en cas de jeûne, alors que l'insuline va l'augmenter après un apport de glucose.

Suivant l'oxygénation de la cellule, le pyruvate aura deux destinées différentes. En cas de déficit en oxygène, en situation d'anaérobie, le pyruvate sera transformé en lactate par la lactate déshydrogénase. Si la cellule a suffisamment d'oxygène, elle est en condition aérobie, le pyruvate entrera dans la mitochondrie où il sera utilisé pour fournir de l'énergie par le cycle de Krebs.

Dans la mitochondrie, le pyruvate sera transformé en acétyl CoA (acétyl coenzyme A) par la pyruvate déshydrogénase. Le cycle de Krebs utilisera cet acétyl CoA pour produire du GTP, du $NADH/H^+$ et du FADH. Grâce à la chaîne respiratoire, le $NADH/H^+$ va fournir trois molécules d'ATP, alors que le FADH va en fournir deux.

Le bilan de la production d'ATP de la glycolyse est de deux ATP consommés pour quatre ATP formés, soit une production de deux ATP et de deux NADH (un NADH équivaut à 3 ATP) par molécules de glucose, ce qui équivaut à huit ATP. Si le pyruvate produit par une molécule de glucose est utilisé par le cycle de Krebs, il y aura production de 15 ATP par tour de cycle. Donc pour une molécule de glucose, il y aura la production d'ATP par la glycolyse et par deux tours de cycle de Krebs, soit, finalement, la production de 38 ATP.

4.1.2 la voie du glycogène

En cas de fort apport alimentaire en glucides, le glucose en excès peut être stocké sous forme de glycogène dans le foie (glycogénogenèse). L'insuline activera la glycogène synthase, qui va former les chaînes de glycogène, à partir d'UDP glucose. L'UDP glucose est synthétisé à partir du G6P.

À l'inverse, en cas de jeûne, la cellule hépatique va transformer le glycogène en glucose (glycogénolyse) pour qu'il soit utilisé par les autres cellules de l'organisme. Deux hormones, l'adrénaline et le glucagon, vont, à l'inverse de l'insuline, induire la dégradation du glycogène en glucose-1-phosphate en activant la glycogène phosphorylase.

4.1.3 la néoglucogenèse

En période de jeûne prolongé, l'hépatocyte peut aussi produire du glucose *de novo* par la voie de la néoglucogenèse. Pour cela, les cellules vont utiliser des précurseurs non glucidiques, comme les acides aminés issus de l'hydrolyse des protéines musculaires ou les triglycérides (TG) du tissu adipeux, et les transformer en intermédiaires de la voie de la néoglucogenèse. Ces intermédiaires seront transformés en glucose par une voie quasiment inverse à la voie de la glycolyse, mise à part trois enzymes clefs : la PhosphoEnolPyruvate-CarboxyKinase (PEPCK, elle peut être cytosolique ou mitochondriale), la fructose-1,6-bisphosphatase et la glucose-6-phosphatase (G6Pase), qui est la dernière enzyme de la voie. Ces enzymes catalysent des réactions irréversibles. Cette voie entraîne la consommation de deux pyruvates, 4 ATP, 2 GTP et 2 NADH/H⁺ pour former une molécule de glucose.

4.2 Le métabolisme des lipides

Les lipides peuvent être classés en cinq groupes plus ou moins lipophiles :

- les acides gras (AG) : constitués d'une fonction carboxylique (partie hydrophile), et d'une longue queue composée d'une suite de carbone liés à des atomes d'hydrogène (partie lipophile), ils sont au final amphiphiles.
- les triglycérides ou TriAcylGlycérides (TG), sont composés d'un résidu de glycérol sur lequel sont fixés trois acide gras, ils servent de stockage des AG dans le tissu adipeux, ils sont lipophiles.
- les phospholipides sont les constituants principaux des membranes cellulaires. Ils sont amphiphiles.
- les glycolipides sont également très présents dans les membranes cellulaires, ils sont aussi amphiphiles.
- les isoprénoïdes sont divisés en deux groupes : les terpènes et le cholestérol. Ce dernier est un constituant important des membranes et permet aussi la synthèse des hormones stéroïdiennes.

Les lipides proviennent soit directement de l'alimentation, soit du métabolisme des glucides, à partir de l'actéyl CoA. Ils sont stockés sous forme d'AG ; en cas de besoin, les acides gras sont dégradés par la β oxydation afin de fournir de l'énergie sous forme d'acétyl CoA aux cellules. Les lipides peuvent aussi fournir de l'énergie aux différents organes. Les acides gras étant lipophiles, ils vont se lier à des transporteurs dans le sang : l'albumine et les lipoprotéines, de densités différentes : les chylomicrons (les moins denses), les VLDL (Very Low Density Lipoprotein), les LDL (Low Density Lipoprotein) et les HDL (High Density Lipoprotein) (les plus denses).

4.2.1 Les acides gras

4.2.1.1 Biosynthèse des acides gras

Après un repas, dans le foie, l'excédent d'acétyl CoA, provenant du métabolisme des glucides, peut être stocké sous forme d'AG, qui sont incorporés dans des TG. Les TG sont transportés par les lipoprotéines vers le tissu adipeux périphérique pour être stockés dans les adipocytes. Les TG fournissent une plus grande densité d'énergie, soit 9 kcal/g par rapport aux glucides, 4.5 kcal/g

[Cohen et al., 2011]. L'acétyl CoA issu de la glycolyse est formé dans la mitochondrie (figure n°12). Il doit donc en sortir, car la synthèse d'AG s'effectue dans le cytoplasme. Pour cela, de l'acétyl CoA et de l'oxalo-acétate s'additionnent pour former du citrate par la citrate synthase. Le citrate utilisera un transporteur spécifique pour les acides tricarboxyliques, pour aller dans le cytoplasme, où il sera clivé en acétyl CoA et en oxalo-acétate par l'ATP citrate lyase. L'acétyl CoA sera ensuite activé en malonyl CoA par l'acétyl CoA carboxylase en utilisant la biotine comme co-enzyme (figure n°13). Un acétyl CoA et un malonyl CoA se lient à l'Acide Gras Synthase (AGS), le résidu acétyl sera transféré au résidu malonyl, les deux ayant préalablement perdu leur CoA. Nous avons une chaîne à quatre carbones toujours liée à l'AGS et nous sommes au premier cycle sur sept pour la synthèse d'un acide palmitique. A chaque nouveau cycle, un malonyl sera fixé à l'AG en cours de synthèse. Quand la chaîne carbonée atteint seize carbones, l'acide palmitique est détaché de l'AGS sous la forme d'un palmitate. La longueur et la saturation de l'AG seront ensuite modifiés selon les besoins.

4.2.1.2 Catabolisme des acides gras : la β oxydation

En cas de jeûne prolongé, les AG stockés sous forme de TG dans le tissu adipeux seront dégradés pour fournir de l'énergie. Les AG seront activés en acyl CoA à N carbones dans le cytoplasme puis transportés dans la mitochondrie grâce à la Carnitine Acyl Transférase (CAT). Un cycle de β oxydation permet de libérer un acétyl CoA et un acyl CoA à N-2 carbones. Les acétyl CoA libérés seront ensuite utilisés par le cycle de Krebs pour fournir de l'énergie (figure n°14).

4.2.2 Les triglycérides

Les TG peuvent provenir de l'alimentation ou des stocks endogènes, situés dans les adipocytes. Les TG issus de l'alimentation sont décomposés en AG et en monoacylglycérols par la lipase pancréatique dans la lumière intestinale (via la lipolyse) afin d'entrer dans les cellules intestinales. Dans les entérocytes, les AG et les monoacylglycérols seront utilisés afin de reconstituer les TG (via la lipogénèse). Ensuite, c'est sous la forme de chylomicrons qu'ils iront dans le système lymphatique qui leur permettra d'atteindre le tissu adipeux et les muscles, en évitant le passage hépatique. Les acides gras synthétisés par le foie seront utilisés pour former des TG, qui seront intégrés aux VLDL. Ces VLDL passeront dans la circulation sanguine. Les

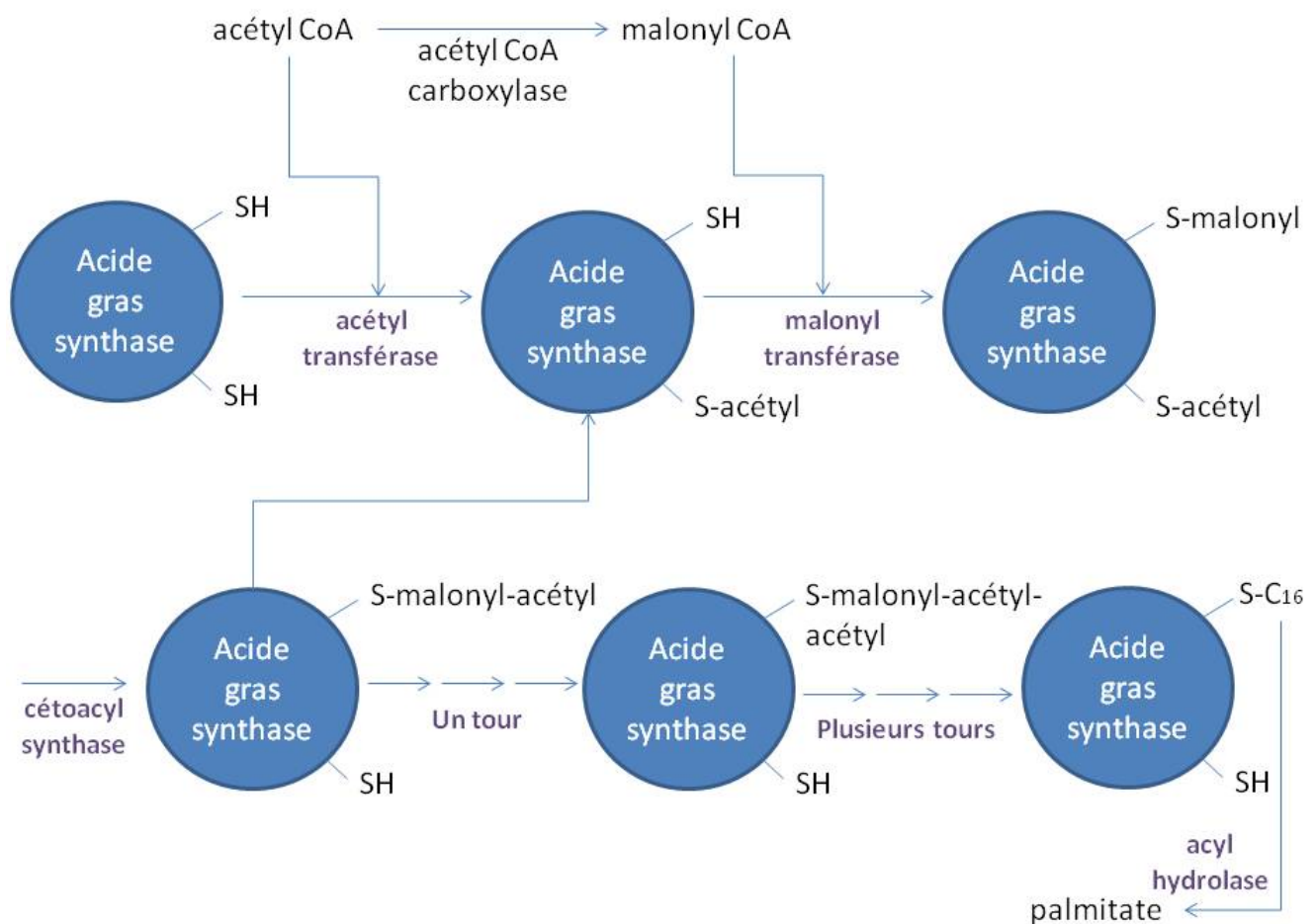


FIGURE 13 – Schéma de la synthèse des AG.

L'AGS va d'abord lier un acétyl CoA, puis un malonyl CoA. L'acétyl sera déplacé et lié au malonyl. Plusieurs tours permettront de lier d'autres molécules d'acétyl afin de former une chaîne à 16 carbones, l'acide palmitique, qui sera libéré.

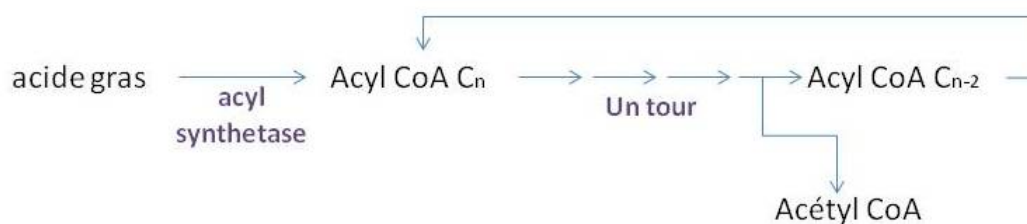


FIGURE 14 – Schéma de la β oxydation des AG.

L'acyl synthétase active l'AG en acyl CoA à n carbones. Plusieurs réactions, composant la β oxydation, vont entraîner la libération d'un acétyl CoA et d'un acyl CoA à $n-2$ carbones. Cet acyl CoA à $n-2$ carbones fera plusieurs tours de β oxydation afin d'être dégradé en plusieurs acétyl CoA.

VLDL, dans le foie, peuvent être transformées en LDL, qui contiennent surtout du cholestérol. Les HDL, libérées dans le sang, vont récupérer le cholestérol en excès des tissus périphériques et le ramener au foie afin de l'éliminer.

Une dérégulation de ces voies métaboliques finement régulées peut entraîner de graves maladies métaboliques.

4.3 Pathologies métaboliques, lipidiques et le syndrome métabolique

4.3.1 Les pathologies métaboliques

4.3.1.1 Les maladies métaboliques génétiques

La majorité des maladies métaboliques est d'origine génétique. Ce sont des maladies rares puisqu'elles touchent une naissance sur 1000 à 2000 (selon les définitions nationales), sans différence selon le sexe, et elles peuvent sauter une génération. Ces maladies résultent d'une déficience génétique qui entraîne l'absence ou la dysfonction d'une enzyme impliquée dans une voie métabolique. La voie métabolique impliquée est donc plus ou moins perturbée selon la gravité de la maladie.

Ces maladies peuvent être classées en trois grands groupes selon leur mécanisme. En voici quelques exemples :

- accumulation de substance toxique. Par exemple, la glycogénose de type 1 entraîne l'accumulation de glycogène dans le foie et le rein et donc une hépatomégalie et une aug-

mentation de la taille du rein. En l'absence de traitement, les patients sont atteints d'hypoglycémie, d'hyperlipidémie et d'hyperuricémie. La mutation de la G6PC correspond à la maladie de type 1a [Froissart et al., 2011].

- déficit de production d'énergie. Cette classe regroupe notamment les maladies de la chaîne respiratoire au niveau de la mitochondrie.
- perturbation de la dégradation ou de la synthèse de protéines complexes. Le déficit en alpha 1 antitrypsine (inhibiteur de la sérine protéase) est un exemple. La protéine anormale synthétisée au niveau du foie, l'alpha 1 antitrypsine Z, reste bloquée dans l'hépatocyte au lieu d'être libérée dans le sang, ce qui entraîne des pathologies diverses allant de la cholestase à la cirrhose (<http://alpha-1foundation.org/fr/alpha-1-maladie-du-foie/>).

Il existe d'autres maladies métaboliques qui ne sont pas génétiques mais acquises. Ces maladies acquises, contrairement aux maladies génétiques, touchent un nombre important de patients.

4.3.1.2 Les maladies métaboliques acquises

Les maladies métaboliques acquises sont dues à différents facteurs externes, comme un régime alimentaire trop riche en graisses, une trop grande sédentarité, des infections et peut-être une exposition à des toxiques (dit obésogènes). L'obésité, entraînée par certains de ces facteurs, peut ensuite causer des pathologies comme le diabète de type 2, une hypertension artérielle, une dyslipidémie, des maladies cardiovasculaires.

Les malades atteints d'un diabète type 2, ou diabète non insulino-dépendant, sont dans la majorité obèses ou en surpoids. Cependant certains malades obèses ne développent jamais de diabète. Les patients diabétiques souffrent d'une résistance à l'insuline, ce qui entraîne une accumulation du glucose dans le sang, l'hyperglycémie. L'incidence de cette maladie augmente dans tous les pays, elle se manifeste généralement après 40 ans avec une incidence maximum entre 75 et 79 ans et touche majoritairement les hommes. La population plus jeune est aussi touchée, avec des atteintes chez des adolescents voire des enfants. En France, la prévalence est d'environ 4.1% de la population en 2011, mais ce chiffre est très sous-estimé, en effet il ne tient pas compte des personnes non traitées ou non diagnostiquées. La majorité des patients non diagnostiqués a moins de 50 ans. Cette maladie évolue lentement et silencieusement. La concentration excessive et constante en glucose sanguin peut entraîner

des lésions vasculaires qui vont accélérer l'athérosclérose à l'origine des AVC (Accidents Vasculaires Cérébraux) ou des infarctus du myocarde. Pour ce dernier, le risque est multiplié par trois chez les patients diabétiques. (<http://www.inserm.fr/index.php/thematiques/circulation-metabolisme-nutrition/dossiers-d-information/diabete-de-type-2-dnid>).

L'hypertension artérielle est définie par une pression anormalement forte, en continu, du sang sur la paroi des artères. En France, 20% de la population est atteinte par cette maladie silencieuse, son incidence augmente avec l'âge même si les malades sont de plus en plus jeunes. Comme les patients diabétiques, beaucoup de patients atteints d'hypertension l'ignorent. De plus, cette maladie est un facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires (comme les AVC, les infarctus du myocarde), l'insuffisance cardiaque ou l'athérosclérose.

4.3.2 Les pathologies lipidiques

4.3.2.1 La stéatose et son évolution

La stéatose est définie comme une accumulation de TG dans le foie. Elle peut être micro-vésiculaire ou macrovésiculaire, suivant la taille des gouttelettes lipidiques présentes dans les hépatocytes. La stéatose hépatique, réversible et bénigne, peut évoluer en stéatose hépatique inflammatoire, ou stéatose hépatique non alcoolique (SHNA ou NASH en anglais), irréversible, caractérisée par la présence d'hépatocytes lésés, une infiltration inflammatoire et l'apparition d'un dépôt anormal de constituants de la matrice extracellulaire, en particulier de collagène, appelé fibrose. La SHNA touche près d'1/3 des adultes et une quantité croissante d'enfants dans les pays développés.

Une cirrhose peut se développer en une dizaine d'années à partir de la SHNA. Dans cette maladie, les hépatocytes sont remplacés par du tissu cicatriciel, composé de collagène de type 1. Ce collagène est produit par les cellules stellaires, activées en cas de lésion hépatique, afin de régénérer le foie lésé. Enfin, la cirrhose peut évoluer en carcinome hépato-cellulaire (figure n°15) [Anthérieu et al., 2011] [Lee et al., 2011].

La stéatose hépatique peut être due à une trop forte production de TG par le foie, à une libération trop faible après leur synthèse, à une augmentation de leur captation (par CD36 par exemple) ou à une diminution de la β oxydation. Un défaut génétique dans l'une de ces voies peut entraîner cette maladie. Cependant, les formes les plus sévères, entraînant l'augmentation de la prévalence de la SHNA sont dues aux changements de quantité et de composition de

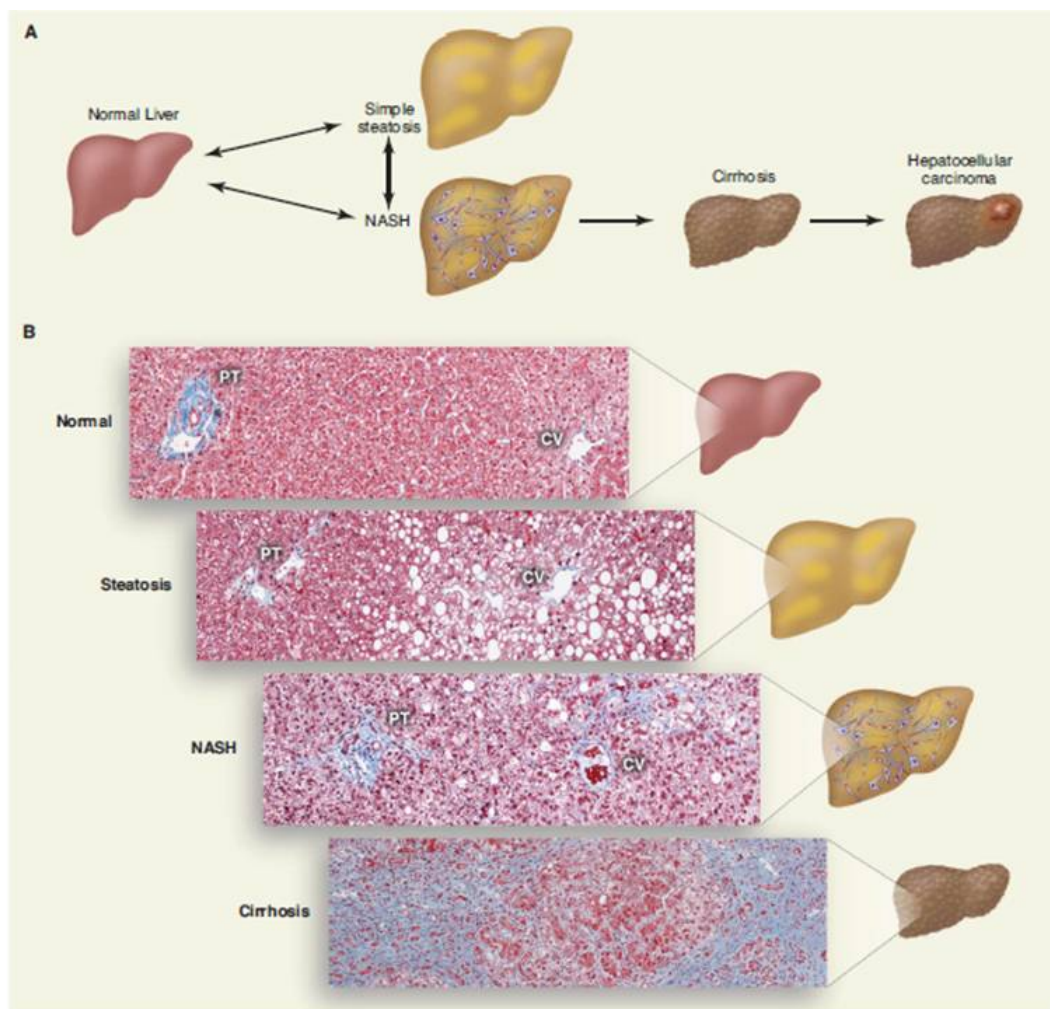


FIGURE 15 – Schéma de l'évolution d'une stéatose hépatique.

(A) Schéma de la progression d'un foie gras. Accumulation de gouttelettes lipidiques contenant des TG, entraînant une stéatose. Apparition d'une SHNA avec une infiltration inflammatoire et une fibrose. La SHNA évolue en cirrhose puis en carcinome hépato-cellulaire. (B) Illustration de sections histologiques des différentes étapes de l'évolution de la stéatose. En bleu : fibre de collagène, PT : triade portale, CV : veine centrolobulaire [Cohen et al., 2011]

l'alimentation, qui souvent induisent une obésité. De plus, la stéatose est fortement corrélée à la résistance à l'insuline et au diabète de type 2 [Cohen et al., 2011] [Wang et al., 2012].

4.3.2.2 L'athérosclérose

Les LDL, contenant surtout du cholestérol, infiltrent et s'accumulent dans l'intima des artères (tunique interne des artères en contact direct avec le sang), où elles seront oxydées. Les LDL oxydées forment une plaque qui va entraîner l'activation de l'endothélium, induisant l'expression de molécules d'adhésion (comme VCAM-1, Vascular Cell Adhesion Molecule 1, ou ICAM-1, InterCellular Adhesion Molecule 1) à la surface de l'endothélium. Des monocytes cir-

culants vont adhérer à ces molécules puis entrer dans l'espace sous-endothélial. Les monocytes se transforment en macrophages qui captent et accumulent les LDL oxydées. Les macrophages ne pouvant dégrader le cholestérol, se transforment en cellules spumeuses qui vont se développer au niveau de l'intima des artères. Cela entraîne une réaction inflammatoire chronique, des cytokines pro-inflammatoires vont entretenir le dysfonctionnement endothélial et entraîner la production de métalloprotéases. Ces dernières vont dégrader la matrice extra-cellulaire et fragiliser la plaque d'athérome.

L'amas de cellules spumeuses dans l'intima, entraîne les stries lipidiques, d'abord intracellulaires, puis extracellulaires. Cela forme le centre athéromateux, recouvert d'une chape fibreuse constituée de cellules musculaires lisses, et qui entraîne une perte d'élasticité des artères.

Ces plaques peuvent aller du simple rétrécissement de la lumière artérielle, la sténose, à l'obstruction du vaisseau, la thrombose, privant un organe de sang (figure n°16). A terme, l'athérosclérose peut entraîner des infarctus (ischémie de certains organes), des anévrismes (formation de poches de sang dans les artères dues à la dilatation de celles-ci), ou des AVC. Les facteurs de risque majeurs sont le tabac, un taux de cholestérol élevé et une hypertension artérielle.

4.3.3 Le syndrome métabolique

Le syndrome métabolique, aussi appelé syndrome X, a initialement été décrit en 1988 par Reaven [Reaven, 1988]. Cet auteur a observé que des patients atteints en même temps d'hypertension artérielle, d'obésité, d'hyperinsulinémie, d'intolérance au glucose et de dyslipidémie (augmentation des triglycérides et du "mauvais cholestérol", taux élevé de LDL), et diminution du "bon cholestérol", (taux faible de HDL) avaient un risque augmenté de développer des maladies cardiovasculaires [Reaven, 1988].

Ce syndrome se caractérise donc par l'accumulation de quatre facteurs de risques :

- l'obésité
- l'hyperinsulinémie
- l'hyperglycémie
- l'hypertension artérielle

Ces différents facteurs de risque peuvent entraîner des maladies cardiovasculaires, des accidents vasculaires cérébraux, ou encore un diabète de type 2.

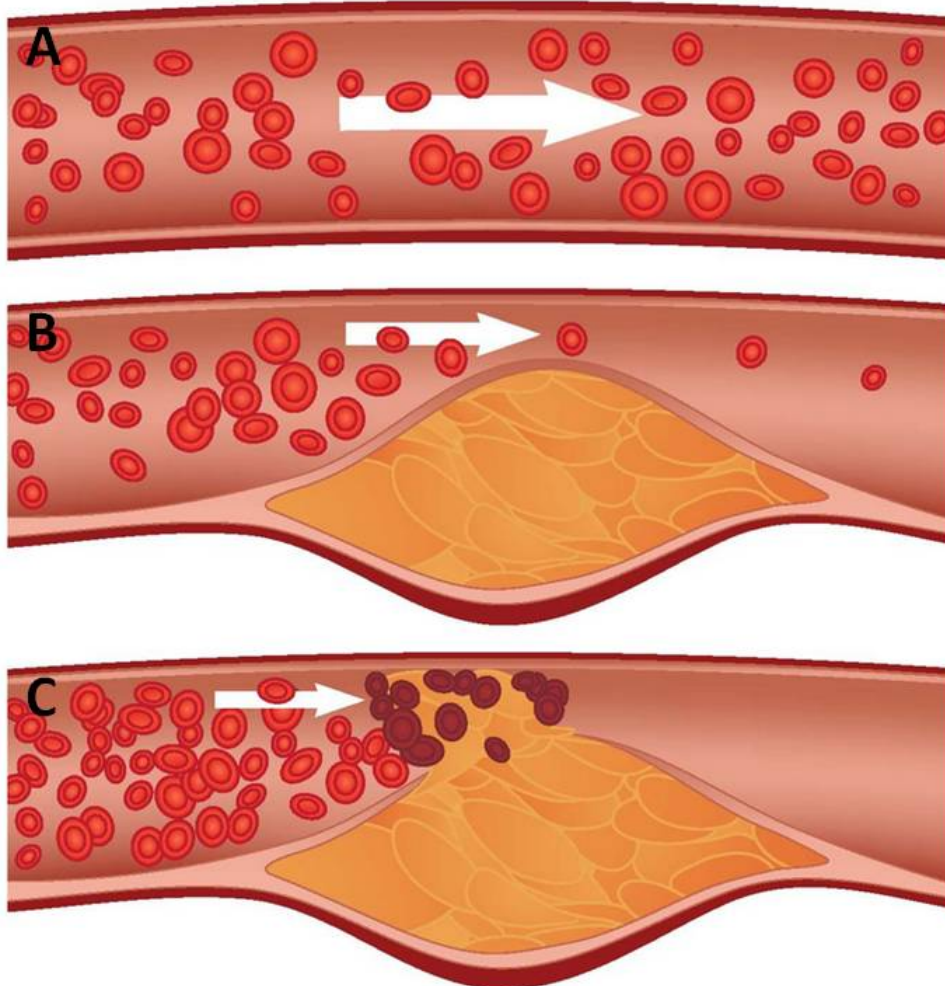


FIGURE 16 – Schéma de l'évolution de l'athérosclérose.

(A) Artère saine. (B) Plaque d'athérose avec réduction de la lumière de l'artère, qui évolue en obstruction (C). http://mouseclique.jax.org/apoeko_or_ldlrko_mouse_models/

Aux États-Unis, 20 à 25% de la population est atteinte, 40% de cette population a plus de 40 ans. Les hommes de plus de 50 ans et les femmes de plus de 60 ans sont les plus touchés. Même si la prévalence augmente avec l'âge, le nombre de malades jeunes augmente de plus en plus.

En France, l'étude DESIR (Data Epidemiological Study on Insulin Resistance syndrome) a été effectuée afin d'évaluer l'incidence du syndrome métabolique. Deux mille cent neuf hommes et 2184 femmes, âgés de 30 à 64 ans, ont participé à cette étude longitudinale du centre-ouest de la France pendant 3 ans. La prévalence du syndrome métabolique chez les hommes est de 16% et celle chez les femmes de 11%. Par classe d'âge (de 30 à 39 ans, de 40 à 49 ans...), la fréquence du syndrome métabolique est 2.5 fois moins élevée que celle observée aux États-Unis [Balkau et al., 2003].

Aucun pays n'est épargné par ce syndrome, mais la France est un des pays les moins touchés.

Il existe plusieurs définitions de ce syndrome. La plus utilisée est celle du NCEP-ATP III (National Cholesterol Education Program- Adult Treatment Panel III), créée en 2001. Cette définition était basée sur des critères cliniques faciles à utiliser. En 2005, l'IDF (International Diabetes Federation) publie une autre définition basée sur le tour de taille de manière ethnique dépendant. Cette définition, très critiquée, entraîne une augmentation de la prévalence du syndrome métabolique. Quatre ans plus tard, en 2009, l'IDF associé à l'AHA (American Heart Association) et au NHLBI (National Heart Lung and Blood Institute), assouplit la définition de 2005, et revient à une définition plus proche de celle de 2001 (figure 17).

Certaines causes, comme la sédentarité et une alimentation trop riche en glucides et en graisses, sont bien établies. D'autres causes commencent à être décrites dans la littérature, et prennent de plus en plus de poids, comme l'hérédité et aussi l'exposition à certains polluants.

4.4 Effets des POP sur le métabolisme glucidique et lipidique

De nombreuses études épidémiologiques, ainsi que des études *in vivo* chez l'animal ou *in vitro* dans des cellules en culture montrent un lien plus ou moins important entre l'exposition aux polluants organiques persistants (POPs) et les désordres métaboliques.

Un programme collaboratif (regroupant US EPA, NIEHS/NTP, NIH, Chemical Genomics

	NCEP/ATPIII (2001)	IDF (2005)	IDF/AHA/ NHLBI (2009)
	3 des 5 critères suivants	tour de taille + 2 des 4 autres critères	3 des 5 critères suivants
Tour de taille élevé	≥ 102 cm/hommes ≥ 88 cm/femmes	indispensable, avec seuils ethno-centrés ; origine européenne ≥ 94 cm/hommes ≥ 80 cm/femmes	seuils ethno-centrés, reprenant les seuils IDF 2005 pour les non-européens et laissant le choix entre seuils IDF et seuils NCEP/ATP III pour ceux d'origine européenne
TG élevés	$> 1,5$ g/L ou traitement	$> 1,5$ g/L ou traitement	$> 1,5$ g/L ou traitement
HDLc bas	$< 0,40$ g/L : hommes $< 0,50$ g/L : femmes	$< 0,40$ g/L : hommes $< 0,50$ g/L : femmes	$< 0,40$ g/L : hommes $< 0,50$ g/L : femmes
PA élevées	PAS ≥ 130 mm Hg et/ou PAD ≥ 85 mm Hg ou traitement	PAS ≥ 130 mm Hg et/ou PAD ≥ 90 mm Hg ou traitement	PAS ≥ 130 mm Hg et/ou PAD ≥ 85 mm Hg ou traitement
Glycémie à jeun élevée	$\geq 1,1$ g/L ou traitement	$\geq 1,0$ g/L ou traitement	$\geq 1,0$ g/L ou traitement

FIGURE 17 – Comparaison de définitions du syndrome métabolique.

Les trois définitions regroupent cinq critères différents. L'association de trois d'entre eux suffit à établir un diagnostic de syndrome métabolique. La définition de l'IDF de 2005 est la seule à fixer l'un des facteurs, le tour de taille, comme critère essentiel au diagnostic. PA : Pression Artérielle, PAS : Pression Artérielle Systolique, PAD : Pression Artérielle Diastolique, HDLc : High density Lipoprotein cholesterol.

<http://www.medscape.fr/voirarticle/3017913>

Center, FDA), appelé Tox21 HTSpr, a permis l'identification de polluants reliés aux maladies métaboliques. Il a été montré que les molécules les plus fortement associées au diabète de type 2 ou à l'obésité sont la TCDD, le DDT, le DDE, le DDD, certains PCB, l'arsenic et la nicotine [Thayer et al., 2012]. Une autre étude a montré une association entre une exposition chronique à des pesticides organochlorés et le diabète de type 2 [Park et al., 2010].

4.4.1 Effets de la TCDD et d'autres agonistes du AhR sur le métabolisme

4.4.1.1 Chez l'animal

Il est estimé que la génétique peut expliquer, au sens large, 25 à 70% de l'obésité. Les 30 à 75% restant seraient dus à des facteurs environnementaux. Une étude a montré que le AhR pourrait jouer un rôle important dans l'obésité, mais aussi dans les complications qui y sont associées. Pour cela, les auteurs ont utilisé deux souches de souris C57BL/6J, la première porteuse de l'allèle *Ahr*^{b1}, caractérisé par un AhR de forte affinité ; et la seconde porteuse de l'allèle *Ahr*^d, caractérisé par sa faible affinité. Après 28 semaines d'un régime gras, les souris ayant l'allèle *Ahr*^{b1} présentaient un poids corporel plus élevé, avec une hépatomégalie plus importante et une concentration plus élevée de cholestérol dans le plasma par rapport aux souris possédant l'allèle du AhR de faible affinité [Kerley-Hamilton et al., 2012].

TiPARP (TCDD inducible Poly ADP-Ribose Polymerase) a été identifié comme étant un des gènes cibles du AhR. En absence de TCDD, la surexpression de TiPARP entraine les mêmes effets que la TCDD. En effet, la surexpression de TiPARP entraine une suppression de la production de glucose, avec une diminution de l'expression des gènes de la néoglucogenèse, PEPCK et G6Pc. Enfin, elle provoque aussi une acétylation et une dégradation par le protéasome de PGC1 α , qui est un co-activateur transcriptionnel de PEPCK et G6Pc dans un modèle de poulet [Diani-Moore et al., 2010].

Chez la souris, des traitements par le PCB 126 et par d'autres PCB "dioxine-like" (77, 81, 169) entraînent une diminution du stock de glycogène et de la néoglucogenèse. L'expression de l'ARNm de PEPCK est aussi diminuée [Zhang et al., 2012]. Cette diminution de l'ARNm de PEPCK a aussi été observée dans une étude publiée par [Angrish et al., 2012b]. Dans cette étude, des souris, nourries par un régime riche en graisses, ont été exposées par gavage à la TCDD. Les auteurs ont aussi observé une diminution des ARNm de PC (pyruvate carboxylase),

de GK (glucokinase), de GYS2 (glycogène synthase 2) et de G6Pc. En revanche, l'expression de l'ARNm de la première enzyme de la glycolyse, l'hexokinase 3, était augmentée. De plus, ces souris présentaient une stéatose hépatique, due à une augmentation de l'absorption des graisses alimentaires et non à la synthèse *de novo* de lipides, l'ARNm de FASN (Fatty Acid Synthase) étant diminué [Angrish et al., 2012b].

Dans une autre étude associant un régime riche en graisses ou standard et une exposition à des agonistes du AhR, des souris femelles (F0) ont été exposées, avant et pendant la gestation, à différents POPs : TCDD, un PCB dioxin-like (PCB 153), BPA (Bisphenol A), et DEHP (Di(2-ethylhexyl) phtalate). Ces POPs ont été utilisés à leur dose journalière admissible (DJA), seuls ou en différents mélanges. Il a été observé, chez la génération de souris F1, qui ont reçu le même régime alimentaire que leur mère, une aggravation des désordres métaboliques induits par l'obésité avec une différence entre les mâles et les femelles. Une aggravation de l'intolérance au glucose, accompagnée d'une altération de l'expression des gènes cibles de la biosynthèse des œstrogènes a été observées chez les femelles. Chez les mâles, il a été observé une altération des gènes cibles de la biosynthèse du cholestérol [Naville et al., 2013]. Dans une autre étude utilisant des souris dont le AhR ne peut se lier au XRE, les auteurs ont montré que le AhR régule l'expression des gènes du métabolisme du cholestérol, sans liaison à l'élément de réponse [Tanos et al., 2012].

L'expression des gènes de la biosynthèse du cholestérol comme l'hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1 (HMGCS1) est aussi diminuée après une exposition à de faibles doses de TCDD (5, 50, 500ng/kg/ jours pendant 18 jours). Les doses utilisées induisent un TEF de 1.2, 17 et 1063 pg/g de tissu hépatique, respectivement. En 2000, la concentration de PCDD/ PCDF et PCB, accumulés dans le foie de japonais non fumeurs a été évaluée à 2.9pg TEF/ g de tissu [Arisawa et al., 2005] [Sato et al., 2008]. Les doses les plus faibles de cette étude, sont donc représentatives de l'exposition réelle de l'Homme [Arisawa et al., 2005]. Une exposition à la TCDD entraine aussi une diminution de l'expression des gènes de la synthèse des AG (FASN) et de la glucokinase (première enzyme de la glycolyse) chez la souris [Sato et al., 2008].

De nombreuses études montrent une perturbation du métabolisme des lipides en présence d'agonistes du AhR. L'activation du AhR induit une stéatose hépatique microvésiculaire, par une accumulation des TG et une diminution de l'oxydation des AG [Kawano et al., 2010]. Le transport des lipides est aussi perturbé. En effet, l'export hors du foie des TG par les VLDL est inhibé, et la transcription de CD36/FAT (Fatty Acid Translocase), un transpor-

teur de lipides chargé de faire entrer les TG dans les cellules, est augmentée [Lee et al., 2010b] [Kawano et al., 2010] [Forgacs et al., 2012]. Il y a, aussi, une augmentation de la mobilisation des lipides au niveau des organes périphériques [Angrish et al., 2012a]. Ces résultats suggèrent que la stéatose hépatique serait due principalement à l'augmentation de l'absorption des lipides par le foie, et non à leur synthèse *de novo*.

Chez le rat, les effets induits par les agonistes du AhR sont les mêmes que ceux observés chez la souris, c'est-à-dire une diminution des activités de la G6Pc, de la PEPCK et de la PC accompagnées d'une hypoglycémie [Weber et al., 1991], d'une stéatose hépatique et d'une résistance à l'insuline [Ruzzin et al., 2010]. A l'inverse de la souris, une étude a montré que le foie de rats traités à la TCDD n'accumulait que très peu de lipides avec, de plus, l'expression de CD36 diminuée [Forgacs et al., 2012].

Chez l'animal, il n'y a pas d'étude montrant un lien entre le diabète et l'exposition à la TCDD ou à un composé "dioxine-like". Il y a seulement des associations d'événements liés à un diabète.

4.4.1.2 Chez l'Homme

De nombreuses études épidémiologiques ont essayé de déterminer le rôle des agonistes du AhR sur le métabolisme, en étudiant notamment un lien potentiel avec l'augmentation de la prévalence du diabète, de l'obésité, du syndrome métabolique. Une des expositions la plus connue à un agoniste du AhR, est l'exposition des vétérans américains à l'agent orange au cours de la guerre du Vietnam, aussi connu sous le nom de la cohorte de l'opération Ranch Hand. Ces vétérans ont manipulé et déversé 45 000 m³ d'agent orange contenant de la TCDD. Dans cette cohorte, il a été montré que les perturbations de la glycémie et la prévalence du diabète augmentaient avec l'exposition à la dioxine. De plus, les perturbations d'insulinémie augmentent avec l'exposition chez les personnes non diabétiques [Henriksen et al., 1997]. Plus précisément, il a été observé que l'exposition à l'agent orange est associée à l'augmentation du rapport cholestérol/HDL et à l'augmentation des TG [Michalek et al., 2001][Greene et al., 2003].

Un autre accident bien connu ayant entraîné une exposition à la dioxine, est l'accident de Seveso. Cet accident est dû à la surchauffe d'un réacteur qui a entraîné la libération d'un nuage contenant une grande quantité de TCDD. Le nuage a contaminé les communes proches de l'usine, et notamment la commune de Seveso. Contrairement à la cohorte de l'opération Ranch Hand, il n'a été montré aucun lien significatif entre l'exposition à la TCDD et l'apparition d'un

diabète ou une perturbation des TG [Greene et al., 2003]. Enfin, aucun lien n'a été démontré entre l'exposition de travailleurs et l'augmentation du diabète de type 2 dans la cohorte NIOSH (National Institute of Occupational Safety and Health). La cohorte NIOSH regroupe des travailleurs exposés à la TCDD lors de la production de produits chimiques, comme le fongicide trichlorophénol, dans 12 usines aux États-Unis et pendant 15 ans. Il a cependant été relevé une augmentation du taux de glucose dans les sérums, chez les travailleurs les plus exposés [Magliano et al., 2014]).

Des travailleurs exposés à une très forte quantité de TCDD, 5000 pg g^{-1} de lipides totaux dans le plasma, présentent, 35 ans plus tard, une hyperlipidémie (avec une augmentation des TG et du cholestérol), des plaques d'athérosclérose et une diminution de l'épaisseur intima-media [Pelclová et al., 2002]. Une autre étude, effectuée sur une population américaine non diabétique exposée à divers POPs (dont PCB "dioxin like", PCDD, PCF), a conclu que ces POPs étaient associés au syndrome métabolique. Les PCB sont notamment associés à une augmentation des TG et à une diminution des HDL, mais aussi à une résistance à l'insuline, des troubles de la glycémie à jeun et une augmentation du tour de taille. Les PCDF seraient plutôt associés à l'augmentation de la pression artérielle [Lee et al., 2007]. Quelques années plus tard, une étude a été menée sur une population toujours non diabétique, consommant des produits de la mer provenant d'un réservoir d'eau de mer contaminé par des PCDD et PCDF. Ces xénobiotiques sont les sous-produits du pentachlorophénol (pesticide), fabriqué par une usine de Taïwan. Cette étude a aussi montré une association significative entre le syndrome métabolique et des doses faibles de PCDD et de PCDF détectées dans le sérum. L'augmentation de la quantité de PCDD et de PCDF dans le sérum est aussi associée à une hyperglycémie, une augmentation de la pression sanguine et du tour de taille [Chang et al., 2010]. Ces deux études montrent une association significative entre l'apparition du syndrome métabolique et l'augmentation de l'exposition à des mélanges de POPs, agonistes du AhR. Chez les populations exposées aux POPs via leur alimentation (poissons contaminés), comme la cohorte des natifs américains Mohawk et celle des pêcheurs sportifs des grands lacs américains, on observe une augmentation de la prévalence du diabète par rapport aux populations moins exposées [Magliano et al., 2014]. Une étude a montré que le développement d'un diabète de type 2 est associé à des concentrations élevées de HCB (HexaChloroBenzène) [Wu et al., 2013], un agoniste faible du AhR [Hahn et al., 1989].

Conclure sur un lien entre l'apparition d'un diabète et l'exposition aux POPs à la vue de ces études est cependant impossible. Certaines études aboutissent à un lien positif, d'autres pas.

Ces études sont beaucoup trop différentes, aussi bien dans le type d'exposition, dans la durée d'exposition, dans la tranche d'âge et le sexe des participants, mais aussi dans le nombre de patients dans chaque cohorte. Par contre, l'exposition aux POPs semble associée au syndrome métabolique, sans que l'on puisse y voir une relation de cause à effet.

4.4.2 Effets de l'endosulfan et d'autres agonistes du ER sur le métabolisme

4.4.2.1 Chez l'animal

Chez la souris gestante, de faibles doses de bisphénol A (BPA) entraînent une hyperinsulinémie et une altération de l'homéostasie du glucose. De plus, six mois après la naissance, la génération mâle F1 présentait une résistance à l'insuline augmentée et des paramètres sanguins altérés par rapport aux souris issues de mères non traitées [[Alonso-Magdalena et al., 2010a](#)] [[Alonso-Magdalena et al., 2010b](#)].

Chez des souris exposées à un mélange de pesticides contenant de l'endosulfan, administré à faibles doses, on observe une différence mâle/femelle au niveau hépatique. Après 4 semaines d'exposition, à des doses extrapolées de la DJA pour la souris, la glutamine, l'alanine, la valine, l'acétate et le l'ATP augmentent chez le mâle. A l'inverse, les métabolites néoglucogéniques (alanine, valine, acétate et lactate) diminuent chez la femelle. Le glycogène et le glucose hépatique augmentent [[Merhi et al., 2010](#)]. Ces différents changements métaboliques pourraient être liés à un début de pathologie comme le diabète.

Certains agonistes du ER, comme l'endosulfan, passent la barrière placentaire. Le traitement de souris gestantes (F0) par ce pesticide entraîne une hyperglycémie plasmatique, mais aussi une diminution des LDL, de la choline et du glucose hépatique, ainsi qu'une augmentation du lactate hépatique chez la femelle F1. Le mâle F1 présente, au contraire, une diminution du lactate hépatique, et une augmentation du lactate plasmatique. Dans cette étude, les souris gestantes F0 ont été nourries avec des aliments contenant de l'endosulfan à la dose journalière admissible (DJA) de l'Homme extrapolée à la souris. Les souris F1 ont également été nourries avec le même régime pendant 11 semaines, puis les dosages ont été effectués [[Canlet et al., 2013](#)].

Une exposition à de faibles doses de Bisphénol A chez le rat mâle a aussi entraîné une augmentation du glucose sanguin [[Alonso-Magdalena et al., 2010a](#)]. Chez le rat, les TG, le cholestérol total, les AG libres et les phospholipides sont augmentés de manière dose dépendant

dans le sérum après une exposition de 21 jours à l'endosulfan [Alva et al., 2012]. A l'inverse, l'activation sélective de la sous-unité alpha du ER, grâce à l'agoniste sélectif 16 α -LE2, chez des rates ovariectomisées et sous régime riche en graisses, entraîne dans le foie une diminution de la lipogenèse, de l'oxydation des AG, de l'accumulation des TG, de l'entrée du glucose et de la sensibilité à l'insuline. Dans le sérum, l'insuline a tendance à diminuer, le cholestérol total et les VLDLs diminuent [Weigt et al., 2012] [Weigt et al., 2013].

Deux études, l'une *in vivo* [Glover et al., 2007] et l'autre *in vitro* [Krøvel et al., 2010], ont montré qu'une exposition à l'endosulfan chez le saumon ou le traitement par ce pesticide des hépatocytes primaires de saumon entraînait une stéatose hépatique.

4.4.2.2 Chez l'Homme

Une équipe a mesuré la quantité et la qualité de pesticides organochlorés retrouvés dans le sérum de personnes atteintes du syndrome métabolique et non diabétiques. Ils ont trouvé trois pesticides dont les concentrations sont significativement plus élevées par rapport au sérum de patients contrôles, ces trois polluants sont le β -hexachlorocyclohexane (β -HCH), l'heptachlor epoxide et le trans-nonachlor, connus pour lier les récepteur aux œstrogènes. Le β -HCH et l'heptachlor epoxide sont significativement et positivement associés à la prévalence du syndrome métabolique, après ajustement par l'âge, le sexe, la consommation d'alcool et de cigarettes [Park et al., 2010].

La cohorte CARDIA (Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study), a suivi pendant 20 ans des jeunes adultes afin de déterminer les facteurs de risques de maladies cardiovasculaires ; elle a été utilisée pour étudier l'association entre des molécules organoclorées et le diabète de type 2. il a été montré que le p,p'DDE, ligand du ER, entraînait une augmentation du BMI (Body Masse Index) et des TG, diminuait la concentration des HDL, mais ne pouvait pas être lié au diabète de type 2. Le trans-nonachlor est, lui, fortement associé au développement du diabète, mais pas aux modifications de BMI ou des niveaux de TG et HDL. Les auteurs concluent qu'une exposition chronique au p,p'DDE pourrait entraîner un état pré-diabétique et que le trans-nonachlor aurait une importance dans la progression de la résistance à l'insuline et au diabète de type 2 [Lee et al., 2010a].

En 2006, il a été montré une relation dose-réponse entre la concentration de pesticides organochlorés dans le sérum et un diabète de type 2, dans la population américaine ayant été exposée à des POPs [Lee et al., 2006a] [Taylor et al., 2013]. Cette concentration est aussi

associée au syndrome métabolique, avec une courbe dose-réponse linéaire, et à la résistance à l'insuline. Dans le syndrome métabolique, les pesticides organochlorés sont associés aux troubles de la glycémie, à l'augmentation du tour de taille et des TG, et à la diminution des HDL [Lee et al., 2007], ce qui pourrait expliquer la résistance à l'insuline et le diabète de type 2.

Toutes ces études, montrent différentes dérégulations induites par des agonistes du ER. Ces dérégulations peuvent aider à comprendre l'augmentation de l'incidence du syndrome métabolique, bien que les mécanismes soient encore inconnus.

4.4.3 Effets des mélanges sur le métabolisme

Des études épidémiologiques ont été réalisées sur les effets de mélanges de polluants. L'étude de Lee et de son équipe, a montré une relation dose réponse entre la concentration de pesticides organochlorés et de PCBs dans le sérum avec l'augmentation du diabète de type 2 dans une population américaine non diabétique. Ce mélange de pesticides organochlorés, de PCBs "dioxin like" et "non dioxin like", est aussi significativement associé à l'augmentation de la prévalence du syndrome métabolique. Les PCBs "non dioxin like" ont la particularité d'avoir une courbe de relation en forme de U inversé. Ce type de courbe a déjà été observé pour les perturbateurs endocriniens, et notamment avec le Bisphénol A [Lee et al., 2007]. Ces courbes mettent en avant l'importance des doses considérées, puisque nous observons des effets plus importants en présence de doses faibles qu'en présence de doses fortes. Il a aussi été montré que les effets biologiques à faible dose des perturbateurs endocriniens ne peuvent être prédits par les effets à fortes doses [Vandenberg, 2014]. Cela rend plus difficile les études *in vitro* mais aussi les études épidémiologiques, car l'Homme est exposé à de nombreux mélanges de xénobiotiques et ce, à de faibles doses pendant des années.

In vivo, les études de POPs en mélange montrent des perturbations du métabolisme. Chez la souris, un régime gras accompagné d'une exposition à un mélange de TCDD, PCB 153, BPA et DEHP à la DJA, a entraîné chez les femelles une aggravation de l'intolérance au glucose et une altération de l'expression des gènes cibles du métabolisme des œstrogènes. Chez les mâles, il a été observé une altération de l'expression des gènes cibles de la biosynthèse du cholestérol [Naville et al., 2013]. En 2010, des rats ont été exposés pendant 28 jours soit à de l'huile de saumon crue contenant un mélange de POPs, soit à de l'huile de saumon raffinée. Le mélange se composait de PCDD, de PCDF, de PCB non-ortho, de PCB mono-ortho, de

pesticides organochlorés, de DDT et de PCB. Les rats exposés à l'huile de saumon crue ont développé une résistance à l'insuline, une dérégulation de l'homéostasie lipidique, une obésité abdominale ainsi qu'une stéatose hépatique, contrairement aux rats exposés à l'huile raffinée [Ruzzin et al., 2010].

Un workshop de l'"US National Toxicology program and the National Institute of Environmental Health Sciences" a conclu que les études sur les POPs avaient généré beaucoup de preuves en faveur de leur implication comme facteur de risque du diabète de type 2 chez l'Homme [Lee et al., 2014]. Mais les différentes étapes moléculaires menant à un syndrome métabolique ou à un diabète de type 2 sont encore largement inconnues.

Le modèle utilisé : les cellules HepaRG

Le foie est l'organe principal chargé de détoxifier l'organisme des différents polluants. La circulation sanguine amène les xénobiotiques au foie, qui va les transformer afin de les éliminer par la voie urinaire ou la voie biliaire. Nous avons donc choisi d'utiliser des cellules hépatiques humaines comme modèle d'étude. Parmi les lignées cellulaires hépatiques humaines existantes, nous avons sélectionné les cellules HepaRG.

La lignée cellulaire HepaRG a été isolée au laboratoire INSERM U522, à Rennes (France), à partir du foie d'une patiente souffrant d'une hépatite C chronique, dont le génome viral n'est pas retrouvé dans les cellules, et d'un hépatocarcinome. Après repiquage, les cellules sont cultivées jusqu'à confluence (état dans lequel elles resteront), dans le milieu de culture Williams E, contenant 11mM de glucose (2 g l^{-1}), de l'insuline ($5\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ soit $0.86\text{ }\mu\text{M}$), d'hydrocortisone ($5\times 10^{-5}\text{M}$), 10% de SVF (sérum de veau fœtal), glutamine (2mM), PS (pénicilline 50 UI/mL, streptomycine $50\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$), pendant 14 jours. Elles sont ensuite cultivées dans les mêmes conditions mais en présence de DMSO (1.5% à 2%) pendant 14 jours. Ce DMSO force et accélère leur différenciation, car les cellules vont devoir mettre en place toute la machinerie des "EMX" (enzymes du métabolisme des xénobiotiques) pour éliminer ce composé. Trente jours après le repiquage, les cellules à confluence, sont différenciées et présentent deux types cellulaires différents : les cellules "hépatocyte-like" et les cellules "biliary-like" (figure n°18). Les deux types cellulaires sont présents dans des proportions à peu près équivalentes et sont identifiables grâce à leur morphologie, mais aussi grâce à des marqueurs cellulaires spécifiques. En effet, les cellules "hepatocyte-like" expriment spécifiquement le CYP3A4, l' α feto-protéine, la cytokératine 18 (CK 18) et l'intégrine $\alpha 1$, alors que les cellules "biliary-like" expriment la CK 19 et l'intégrine $\alpha 6$ [Cerec et al., 2007].

Cette lignée a la particularité, une fois différenciée, d'exprimer des marqueurs hépatiques comme l'albumine et l'aldolase B, mais aussi de nombreuses EMX et des xénosenseurs. En

effet, contrairement aux autres lignées cellulaires hépatiques, comme les cellules HepG2, les HepaRG expriment différents CYP, comme le CYP 1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2E1, CYP3A4, mais aussi des récepteur nucléaires comme AhR, CAR et PXR à des niveaux comparables aux hépatocytes primaires humains (HPH). Des enzyme de phase 2, des transporteur ABC, des transporteurs SLC (Solute Carrier) sont aussi exprimés [Guillouzo et al., 2007]. Les récepteurs AhR, PXR et CAR sont fonctionnels, car des ligands spécifiques de ces voies entraînent l'induction de l'expression des CYPs spécifiques [Kanebratt and Andersson, 2008]. La famille des CYP4, ayant un rôle dans le métabolisme et l'homéostasie des lipides, est aussi exprimée. Ces cellules expriment 81 à 92% des gènes actifs dans les HPH de deux jours [Rogue et al., 2012], leurs canalicules biliaires sont fonctionnellement actifs et elles ont la capacité de recréer des pathologies comme la phospholipidose, la cholestase ou la stéatose [Anthérieu et al., 2012]. Les CYP2D6 et 2C9 présents dans les HepaRG sont des variants alléliques et non les gènes sauvages, leur capacité métabolique est réduite [Andersson et al., 2012]. Une équipe cherchant à mettre au point un foie artificiel a montré que les cellules HepaRG, dans un bioréacteur, formaient des "clusters" capable d'éliminer l'ammonium, de produire de l'urée et d'éliminer le galactose [Hoekstra et al., 2011] [Andersson et al., 2012]. Les cellules HepaRG ont été comparées aux cellules HepG2 et aux HPH après une exposition à différentes molécules comme l'œstradiol et la TCDD. Dans tous les cas, les HepaRG sont comparables aux HPH [Jennen et al., 2010]. Une autre étude comparant les cellules HepaRG aux cellules IHH (Immortalized Human Hepatocytes) a montré que ces deux lignées étaient proches. En effet, elles expriment les gènes impliqués dans le métabolisme et l'homéostasie du glucose, sauf la glucokinase. Elles répondent aux conditions glucidiques (présence de glucose dans le milieu), le récepteur à l'insuline est exprimé et fonctionnel, alors que celui du glucagon, étant très faiblement exprimé, n'est pas fonctionnel. La voie néoglucogénique peut quand même être activée grâce à la forskoline. Les gènes de la lipogenèse sont exprimés et peuvent être régulés par le glucose et l'insuline. Les récepteurs impliqués dans la clairance des lipoprotéines sont aussi exprimés, comme le récepteur des LDL (LDLR) [Samanez et al., 2012]. De plus, leurs expressions sont stables pendant au moins quatre semaines après différenciation et comparables à celles des HPH en culture de un à trois jours [Jossé et al., 2008].

Ainsi, de nombreuses études sont arrivées à la conclusion que les cellules HepaRG étaient le modèle le plus proche des HPH [Anthérieu et al., 2011] [Anthérieu et al., 2012], mais aussi un bon modèle pour l'étude du métabolisme du glucose, ainsi que celui des lipides et des

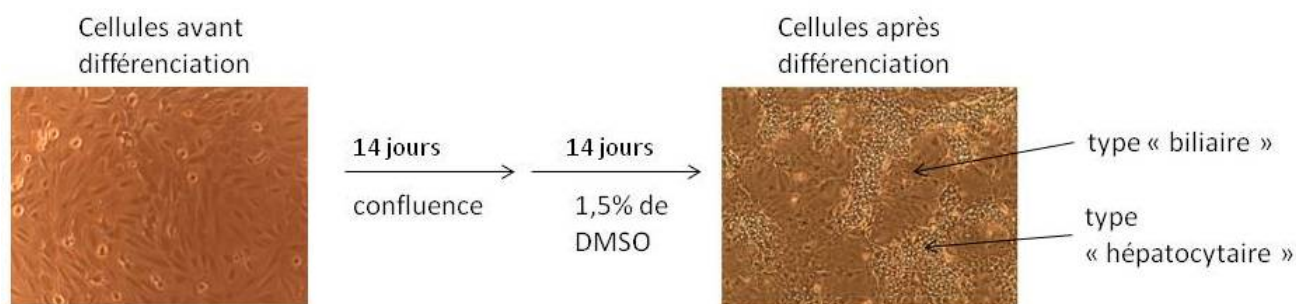


FIGURE 18 – Photographie des cellules HepaRG indifférenciées et différenciées. Les cellules HepaRG indifférenciées seront cultivées 14 jours jusqu'à ce qu'elles atteignent la confluence. Puis elles seront de nouveau cultivé 14 jours en présence de DMSO afin de les différencier. Une fois différenciées, les cellules présentent deux types cellulaires, les cellules "biliary like" et les cellules "hepatocyte like" en proportions 50%/50% environ.

lipoprotéines [Rogue et al., 2012] [Samanez et al., 2012].

Objectifs du travail de thèse

Mon travail de thèse a eu pour objectif d'étudier les effets de l'activation de voies de signalisation différentes, qui peuvent être activées par des polluants appartenant à des familles différentes. Les polluants choisis ont été la TCDD, une dioxine dont la majeure partie des effets est relayée par le AhR et l'alpha endosulfan, l'isomère alpha d'un pesticide organochloré qui a été décrit comme pouvant activer soit le PXR soit le ER. De plus, la TCDD est un contaminant des pesticides organochlorés qui peut être produit au cours de la synthèse de ces derniers ; enfin des effets croisés du AhR et du ER ont été décrits. Des études anciennes du laboratoire dans la lignée de carcinome mammaire humain MCF7 avaient montré que l'expression du CYP1A1, un gène classiquement activé par la TCDD était diminuée quand les cellules étaient traitées par le mélange TCDD/endosulfan [Couvoul et al., 2001], et que le pesticide pouvait aussi activer le PXR dans la lignée d'hépatocarcinome humains HepG2 [Couvoul et al., 2002].

Dans une première partie, une étude transcriptomique des cellules HepaRG différenciées après traitement par chaque polluant seul ou le mélange a été effectuée. Cette étude a permis d'identifier des gènes régulés de manière plus importante par le mélange que par les polluants seuls. Plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme glucidique ont été identifiés au cours de cette étude avec une diminution très importante de leur expression par le mélange. Peu d'études ont été réalisées dans ce modèle cellulaire sur le métabolisme énergétique, car la majorité des études portent sur le métabolisme des xénobiotiques. C'est pourquoi, dans la deuxième partie de la thèse, nous avons étudié l'implication du mélange des deux polluants sur le métabolisme des glucides dans cette lignée. Enfin, dans une troisième partie, nous avons analysé les mécanismes de la régulation de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme de l'alcool (alcool déshydrogénases et CYP2E1) par la TCDD.

Résultats expérimentaux

Chapitre 1

Etude n°1 : étude du transcriptome des cellules HepaRG traitées par le mélange TCDD/ α endosulfan

1.1 Introduction

Dans cette première étude, les cellules HepaRG ont été traitées à la TCDD, 25 nM, et à l' α -endosulfan, 10 μ M, seuls ou en mélange, pendant 30h. Une étude transcriptomique a été effectuée en utilisant des puces Affymétrie afin d'identifier l'effet sur le niveau d'expression des gènes, de la co-activation par les deux polluants par rapport à l'activation par chaque polluant isolé. Les doses utilisées sont des doses délibérément fortes afin d'identifier un maximum de cibles. Une étude statistique, utilisant un test t avec une p-value ≤ 0.05 , en prenant une variation d'expression de deux fois, a permis de sélectionner les gènes qui sont diminués de moitié au moins ou augmentés de deux fois au moins par les traitements. Les résultats ont été représentés dans un diagramme de Euler. Une autre analyse statistique utilisant le logiciel Focus, utilisant un rapport supérieur ou inférieur à 1.2, avec une p-value ≤ 0.05 , a aussi été effectuée. Ensuite, une analyse par le logiciel Ingenuity a été effectuée afin de déterminer à quels chemins métaboliques les gènes dont l'expression est modulée appartiennent. Les modifications d'expression d'ARNm ont été ré-évaluées par RT-qPCR pour certains gènes. De plus, des expériences utilisant des concentrations plus faibles des deux polluants pendant un temps plus long de huit jours ont été réalisées.

**A mixture of persistent organic pollutants which act through different xenosensors
(alpha-endosulfan and 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin) interacts and downregulates
multiple genes involved in human hepatocyte lipid and glucose metabolism**

Ariane Ambolet-Camoit ^{1, 2, 3, ¶}, Chris Ottolenghi ^{1, 2, 4, ¶}, Alix Leblanc ^{1, 2}, Min Ji Kim ^{1, 2},
Franck Letourneur ^{2, 5}, Sébastien Jacques ^{2, 5}, Nicolas Cagnard ^{2, 5}, Christiane Guguen-
Guillouzo ^{6, 7}, Robert Barouki ^{1, 2, 4} and Martine Aggerbeck ^{1, 2, *}

¹ Inserm UMR-S 1124, Paris, France

² Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

³ Present address : Inserm U 845, Hôpital Necker-Enfants-Malades, Tour Lavoisier, Paris,
France

⁴ APHP, Hôpital Necker Enfants Malades, Service de Biochimie Métabolique, Paris, France

⁵ Plateforme de Génomique, Institut Cochin, Paris, France

⁶ Université de Rennes 1, Rennes, France

⁷ Inserm, UMR991, Rennes, France

* Corresponding author

E-mail : martine.aggerbeck@parisdescartes.fr

¶ Both authors contributed equally to the manuscript

Abstract

Mechanistic investigations of pollutant effects usually focus on a single compound. However, individuals, typically, are exposed to mixtures of environmental xenobiotics affecting multiple organs and acting through different xenosensors and pathways in species and cell-type specific manners. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and α -endosulfan are Persistent Organic Pollutants (POPs) and endocrine disruptors which act through different xenosensors and accumulate in the liver. Our objective in this HEALS study was to investigate the effects of the mixture of these POPs on gene expression in a human-derived hepatocyte cell line, HepaRG. We found that, in spite of having largely uncorrelated effects, TCDD and α -endosulfan, when mixed, alter the expression of genes by diverse mechanisms. The combined effects of the mixture of the POPs significantly altered the expression of 100 genes (42 up- and 58 down-regulated) whereas the same concentration of either POP alone did not alter significantly the expression of these genes. For 32 other genes, selective inhibitory crosstalk between TCDD and α -endosulfan was observed. One of the POPs inhibited the effect, on gene expression, of the other in the mixture although, when used alone, that POP did not affect expression. The expression of another 82 genes was significantly altered (up- or down-regulated) by a single POP. The addition of the second POP either increased, in the same direction, the effect on gene expression or had no further effect. At low concentrations (0.2nM TCDD and 1 μ M α -endosulfan), the POPs still had significant effects and the levels of expression of the corresponding proteins were found to be affected for some genes. Particularly striking was the 80-90% inhibition, by the mixture, of the expression of a number of genes of several hepatic intermediary metabolic pathways (glycerolipid metabolism, FXR/RXR activation, glycolysis/gluconeogenesis, retinoid and bile acid biosynthesis), whereas each pollutant alone had only a moderate effect.

Introduction

Environmental exposure to toxic chemicals for most individuals involves mixtures of compounds and extended periods of exposure. Humans are exposed not only to pesticides (estimated use exceeding 3 billion tons per year worldwide), mainly through food consumption, but also to a variety of other environmental xenobiotics, many of them being endocrine disruptors, which may have a variety of detrimental effects on human health [1, 2]. Epidemiological studies often associate occupational exposure to these compounds with an increase in the incidence of various pathologies, including cancers, neuro-degenerative disorders, reduced fertility and the metabolic syndrome which can lead to type 2 diabetes [3-10]. Although concerns about the adverse effects of mixtures of chemicals and their potential interactions are increasing, especially for vulnerable populations, most studies on the effects of pollutants to date have focused on exposure to a single compound or to a mixture of compounds that act through the same signaling pathway. Only a few studies [11-18] have addressed the toxicity of mixtures of contaminants which act through different xenosensors, even though combinations of different chemicals, especially at low levels of exposure, probably have significant effects on human health [19, 20].

In this study, part of the HEALS exposome European project, we investigated the effects of a mixture of two endocrine disruptors, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and α -endosulfan, which act via different signalling pathways, accumulate in the liver and may have non-cancerogenic toxic hepatic effects in humans [21- 24]. TCDD is a potent ligand of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) which triggers several biological responses [1]. Alpha-endosulfan is the major isomer of an organochlorine insecticide known to act through two different signalling pathways, the pregnane X receptor (PXR) [25, 26] or the estrogen receptor α (ER α) [12, 27]. Although α -endosulfan use has been banned in many

countries, it is still in use in China and India and decades of agricultural use have built up soil reservoirs. Endosulfan sulphate, which is a major metabolite of α -endosulfan is as toxic as the parent compound and more persistent with a half-life of months to years in soils, sediments and water [21, 22, 28]. Moreover, since dioxins are by-products of chlorinated compounds, both pollutants can be associated during pesticide manufacturing. *In vivo*, pollutant induced toxic effects on the liver arise from direct effects on hepatocytes and from extra-hepatic factors. Among extra-hepatic factors that may alter hepatocyte function, the disruption of the endocrine system [29, 30] or pollutant induced modification of the environment of the organ may affect hepatic physiology. For example, environmental factors may produce local hypoxia (in erythrocytes for example) by various mechanisms and lead to the release of pro-inflammatory cytokines into the systemic circulation, activation of hormonal stress responses and activation of HIF-1 α , all of which may play a role in metabolic disorders [31-36]. Further, TCDD and α -endosulfan are known to produce oxidative stress which may also play a role in metabolic disorders [1, 37].

The objective of this study was to investigate the effects related specifically to hepatocyte cell functions of the mixture of TCDD and α -endosulfan, which act through different xenosensors, by studying global gene expression in a human-derived hepatocyte cell line, HepaRG.

To our knowledge, few studies have explored the effects on global gene expression of a combination of two Persistent Organic Pollutants (POPs), which act through different xenosensors, using a human liver cell model. HepaRG cells were chosen for the study because, after differentiation, they express high levels of several xenobiotic metabolizing enzymes and xenosensors [38] and, to date, it is the human cell line that most closely resembles human hepatocytes [39, 40]. A recent transcriptomic study, using five carcinogens, revealed that the HepaRG model was better suited for understanding the biological effects of

exposure to the chemicals as compared to the HepG2 hepatocarcinoma cell line which has a low metabolic capacity and reduced PXR level [41-43]. Several other studies also have concluded that the HepaRG cell line is an excellent *in vitro* model to study human drug metabolism [39, 44-46] as well as being a relevant model for studying glucose, lipid and lipoprotein metabolism [47, 48]. The use of the HepaRG cell line, which also exhibits stable and inducible enzyme expression over long periods (weeks), and has reduced variability, thus avoids many of the difficulties associated with the use of human hepatocytes such as scarce availability, complicated isolation procedures, variability, rapid dedifferentiation precluding long term use and cost [49-52].

Previously published studies concerning the effect of TCDD, alone, using primary or permanent hepatic cell lines [42, 53-58] as well as *in vivo* studies in animals [59-65] form a basis for understanding the effects of the mixture.

In this study, in addition to finding that treatment of HepaRG cells with the mixture of POPs up-regulated genes involved in the molecular mechanisms of cancer, cell cycle control or AhR signalling, we also observed mixture-specific effects with the pollutants. Particularly striking was the strong inhibition (80 to 90%), by the mixture of POPs, of the expression of a number of genes which belong to several metabolic pathways (glycerolipid metabolism, FXR/RXR activation, glycolysis/gluconeogenesis, retinoid and bile acid biosynthesis), whereas each pollutant alone had only a moderate effect. Finally, this study provides new data concerning the usefulness of HepaRG cells as a model system for understanding the effects of xenobiotics on human hepatocytes.

Materials and Methods

Compounds, cell culture, viability and treatments

The chemical compounds that were used in this study, 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin or TCDD (PubChem CID: 15625) and α -endosulfan (PubChem CID: 3224), were obtained from LGC Standards (France). HepaRG cells, obtained from Dr. Guguen-Guillouzo [66], were differentiated as described previously except that 1.5% DMSO was used for cell differentiation [67]. DMSO was removed from the medium for twenty-four hours before treating the cells for 30 hours with 25nM TCDD, 10 μ M α -endosulfan, the mixture of the two pollutants (at the above concentrations) or the vehicle (0.15% DMSO). The viability of the cells was evaluated using the WST-1 kit (Roche Applied Science). For some experiments, the cells were treated for 8 days with lower concentrations of the compounds (0.2; 0.5; 1 or 5 nM TCDD and 1 or 3 μ M α -endosulfan) with only two changes of medium containing the compounds during this period (day 0 and day 4) to minimize any build up in the concentrations of the chemicals due to binding of the xenobiotics to the plastic of the culture dishes.

RNA preparation and microarray hybridization

RNA from the HepaRG cells was prepared using the RNeasy mini kit from Qiagen (France) as described previously [68] except that a DNase I step was included in the protocol. For the microarray studies, the quality of the RNA (RIN value) was assessed with a Bionalyzer (Agilent Technologies) [69].

ssDNA (sense single stranded DNA) was synthesized using the Affymetrix GeneChip Whole Transcript Sense Target Labelling Assay kit, according to the manufacturer's protocol. ssDNA samples were then fragmented according to the Affymetrix protocol. The

purified ssDNA was quantified and its quality was assessed with a Bioanalyzer. Subsequent labeling of the samples was performed by synthesis of Biotin-labeled ssDNA using the GeneChip WT Terminal Labeling kit (Affymetrix). ssDNA targets were hybridized onto high-density microarrays (Affymetrix Human Genome 1.0 ST GeneChip array) according to the Affymetrix Eukaryotic Target manual. The microarrays were then washed and stained using the Affymetrix fluidics station 450/250 and Genechip Operating Software and scanned with an Affymetrix GeneArray scanner. The raw affymetrix datasets (.CEL) are available in the Gene Expression Omnibus database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) with the accession number (GSE46874).

Microarray analyses

Quality controls, including scaling factors, average intensities, background intensities, noise (raw Q) values were within acceptable limits for all the arrays. The twelve datasets obtained were processed and normalized using the plier program in R. Two different statistical analyses were performed: 1) we determined which genes were significantly differently expressed ($p \leq 0.05$ by t-test, >2fold difference) following exposure of cells to TCDD, α -endosulfan or the mixture of the two as compared to the vehicle (DMSO), 2) we used the Focus software [70], as described by Garcia-Ortiz [71] to select genes that had at least a 1.2-fold mean difference in expression and a default “interest score” of >5. Principal component analysis (PCA) was carried out using the svd module in R. Hierarchical clustering analysis was performed with the Genepattern software [72] on the statistical scores derived from the Focus analysis rather than on the expression levels in order to reduce data variability.

Gene Set Enrichment Analysis (GSEA, <http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>) was used to test (using a metric derived from the Kolmogorov-Smirnov statistic [73, 74]) whether the distribution of the genes in our study deviated from random in ranked lists of genes up or down regulated by TCDD or 17 β -estradiol. Rank-rank hypergeometric overlap was also used to identify statistically significant overlap between gene expression signatures [75]. The lists of genes were derived from an analysis of publicly available (literature or public repositories) genome-wide expression data obtained from exposure of primary human hepatocytes [53, 58], HepaRG [42] or mouse primary hepatocytes [55] to TCDD or 17 β -estradiol. Raw data were renormalized with the plier module in R and robust averages calculated with Tukey's Bi weight average algorithm [76]. One way analysis of variance (ANOVA) was calculated for each pair of treatment groups and for all treatment groups. FDR were calculated by the Benjamini-Hochberg approach [77]. Differentially expressed genes were those having a fold change >2 and p<0.05. The data from supplementary files 11 and 17 from Forgacs et al. [58] were filtered as indicated in the files. Murine expression data from Flaveny et al. [55] were also analyzed with Focus. Genes were ranked according to Focus scores and filtered to retain only those showing a differential expression with t-test p-values less than 0.20 on log ratios. The genes with the highest Focus scores (165 and 195 genes up- and down-regulated, respectively, by TCDD) were selected as the gene sets to be compared with our samples. Exact area-proportional Euler diagrams were calculated and drawn with eulerAPE [78].

Functional analysis

Biological functions and pathways were generated from the Focus lists of genes up- or down-regulated by TCDD plus α -endosulfan (as compared to either DMSO, TCDD or α -

endosulfan alone) and analyzed using Ingenuity Pathway Analysis v.8.3-3003 (IPA, Ingenuity Systems, CA).

Quantitative reverse transcriptase PCR

A selected set of genes was analyzed by RT-qPCR using cDNA prepared from the 3 independent culture replicates used for the microarray experiments. The PCR primers used are listed in Table 1. Reverse transcription and quantitative PCR were performed as previously described [68].

Western blotting

Cells were scraped into 1X PBS buffer, containing 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate and 0.1% SDS, protease and phosphatase inhibitors (Sigma). After freezing at -80°C, the cells were thawed and centrifuged 10 min at 9 000g at 4°C. The protein concentration in the supernatant was measured using the bicinchoninic acid method (Pierce) with BSA as a standard. The supernatant was aliquoted and kept at -80°C. Equal amounts of total proteins were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Blocking of the membrane was performed using Odyssey buffer (LI-COR, ScienceTec, Courtaboeuf, France) for 1 hour at room temperature followed by incubation overnight at 4°C with a primary antibody directed against ADH1 (Acris AP16311PU-N, 1/1 000). After three washes with 0.1% Tween-20 in 1X PBS, the membrane was incubated with an anti-goat secondary antibody (IRDye 800 number 926-32214 LI-COR, ScienceTec, 1/15 000). After three washes (0.1% Tween-20 in 1X PBS), signals were quantified using the Odyssey infrared Imager (LI-COR, ScienceTec).

Results

Global gene expression in HepaRG cells treated with TCDD and α -endosulfan

The concentrations of TCDD (25 nM) and α -endosulfan (10 μ M) were chosen so as to maximize the activation of the corresponding signalling pathways and, thus, to increase the number of genes that are differentially expressed. To assess the overt toxicity of these concentrations, the viability of the differentiated HepaRG cells was measured and was found not to be significantly different following exposure for 72 hours to the mixture or to either POP alone as compared to the 0.15% DMSO vehicle (Figure S1, A) or for up to 8 days at lower concentrations of the POPs (Figure S1, B). These concentrations were, therefore, used to investigate the effects of the POPs on global gene expression.

Principal component analysis (PCA) of the global variation in transcription of the HepaRG genome following exposure to the mixture or to each pollutant alone leads to several conclusions. First, the samples clustered by condition, which demonstrates that there is a significant difference in the transcription profiles that resulted from exposure to either POP alone or the mixture (Figure 1). Further, the samples treated with TCDD (alone or in combination with α -endosulfan) consistently mapped to one side of the first principal component (which represents 55% of the variability). Alpha-endosulfan-treated samples mapped to one side of the second principal component (which represents an additional 20% of the variability). The first principal component, PC1, thus accounts mainly for the effects of TCDD and the second principal component, PC2, for the effects of α -endosulfan. Second, the major effects of TCDD and α -endosulfan are largely uncorrelated because the corresponding PCA axes are orthogonal. This result is consistent with these compounds exerting their effects by different mechanisms (pathways) and with our current knowledge of the actions of

these pollutants. Third, although the major effects of TCDD and α -endosulfan are largely uncorrelated, the principal component analysis also clearly demonstrates that the effects of the mixture of α -endosulfan and TCDD are greater than those of TCDD alone as shown by the significant difference ($p < 0.05$, post-Anova Tukey's test) in the mean PC1 values of the corresponding groups. Thus, in general, α -endosulfan exacerbates the effects of TCDD in the same direction of change that is most strongly associated with TCDD.

We next analyzed the global transcription data for differentially expressed genes using stringent criteria ($p \leq 0.05$, >2 -fold difference in expression for up-regulated genes and < 0.5 for down regulated genes). The mixture of pollutants significantly altered the expression of 182 annotated genes, whereas TCDD and α -endosulfan altered the expression of 98 and 23 genes, respectively, as compared to the DMSO vehicle. Representation of the results with a Euler diagram shows that the 214 unique genes corresponding to the three treatments can be divided into 7 ensembles (Figure 2) from which additional novel conclusions can be drawn.

First, the two ensembles labelled A, B are remarkable in that 21 genes (ensemble A) were modified only following treatment of the cells with TCDD and 10 genes (ensemble B) were modified only following treatment with α -endosulfan (Figure 2, left, Table 2). Intuitively, one would expect that if the expression of a gene was altered following treatment of the cells with a pollutant individually, then treatment with a mixture containing that pollutant would also affect the expression of the gene. However, in this case, although each pollutant significantly alters the expression of certain genes when present alone, the presence of the other POP in the mixture abolishes this effect (that is, the expression of the gene is no longer found to be significantly differentially expressed by the mixture of the pollutants). This suggests that inhibitory cross-talk occurs between the pollutants at the level of gene expression. It is important to note that the POP that is inhibitory in the mixture is not identified as significantly altering the expression of the gene when used alone. This aspect

distinguishes ensembles A and B from ensemble C. The single gene in this ensemble (serine dehydratase) was significantly modified by either TCDD (61% decrease in expression) or α -endosulfan (6.37-fold increase in expression), individually, but in opposite directions, resulting in the gene not being differentially expressed in the mixture (the 1.66-fold increase in expression was below the 2-fold change required by the stringent criteria). The results obtained by global transcriptome analysis were very similar to those obtained by RT-qPCR (see below). Increasing the stringency of the filters to an absolute fold change >2.2 and $p < 0.05$ reduces the total number of genes differentially expressed from 214 to 122. However, although the number of genes decreases in ensembles A and B, 6 and 5 genes, respectively, remain (Figure 2, right side). These genes are underlined in Table 2. Thus, although the second pollutant by itself does not significantly affect gene expression, when present in the mixture, it inhibits the effect of the first pollutant which has an effect alone. Note that decreasing the stringency increases the number of genes in both ensembles A and B.

Second, an ensemble of 100 genes (ensemble D) is identified only after treatment of the cells with the mixture of the POPs (Figure 2, left, Table 2). That is, the expression of each of these genes is not significantly altered following exposure of HepaRG cells to either TCDD or α -endosulfan alone but only to the mixture of the pollutants. Thus, although treatment with either POP alone may not result in a significant effect (according to the stringent criteria adopted for identifying differentially expressed genes), the mixture of the POPs does result in significant alteration in gene expression. Since the experiment was not designed to evaluate additivity or synergy of effects, no conclusions can be drawn in this respect although the fold changes in expression found for the genes altered by the mixture are not markedly different from the sums of the fold changes in expression obtained following exposure to each pollutant alone.

Third, two other ensembles are composed of genes which are differentially expressed by cells following exposure to either TCDD or the mixture of TCDD and α -endosulfan (70 genes, ensemble E, Figure 2, left, Table 3) or to α -endosulfan or the mixture (6 genes, ensemble F, Figure 2, left, Table 3). Thus, exposure to one pollutant results in a significant change in gene expression and the addition of the second pollutant does not eliminate this effect as in ensembles A, B and C. For most of the genes in ensembles E and F, TCDD and α -endosulfan exert their effects in the same direction (either both increasing or both decreasing gene expression). For some genes, TCDD seems to exert the major effect and α -endosulfan does not further alter the expression of the gene. Finally, for some genes, α -endosulfan diminishes somewhat the effect of TCDD and for one gene, TCDD appears to diminish the effect of α -endosulfan (similar to the inhibitory cross-talk described for ensembles A, B and C). However, in all cases, the effect of the second pollutant is not sufficient to eliminate the gene from the list of differentially expressed genes in contrast to what is observed for the genes in ensembles in A, B and C. Although the effect observed in ensembles E and F resembles that observed in ensembles A, B and C, the mechanisms involved are not necessarily the same.

The final ensemble, G, is composed of 6 genes (Figure 2, left, Table 4) which are differentially expressed ($p < 0.003$ - 0.00001) following all of the treatments (TCDD or α -endosulfan alone or the mixture). Interestingly, as opposed to all the other ensembles in which both increases and decreases in gene expression are found, this ensemble is composed of genes in which only a decrease in expression is observed and both TCDD and α -endosulfan exert their effects in the same direction. For three of the genes, there is a significant difference in expression between the mixture and either TCDD ($p < 0.002$) or α -endosulfan ($p < 0.0004$) alone, for one gene there is a significant difference between expression in the

mixture and α -endosulfan alone ($p < 0.004$) and for the remaining two genes there is no difference between expression in the mixture as compared to either POP alone.

In a second approach to identify differentially expressed genes, we ranked genes using a combination of multivariate and pairwise comparisons among all the conditions using somewhat less stringent conditions (a cutoff of 1.2 for the fold change and a Focus score of 5, followed by a two-tailed t-test, $p < 0.05$). Exposure of HepaRG cells to the mixture of pollutants altered, to a greater extent, the expression of 662 annotated genes (558 upregulated and 104 downregulated) as compared to exposure to either chemical alone. An additional 289 non-annotated transcripts were also found (211 up- and 78 down-regulated). The top 10 up- and 10 down-regulated genes are listed in Table 5.

We then compared the list of those 20 genes (top 10 up- and down-regulated genes) with the lists of genes identified with the stringent conditions (stringent t-test analysis). Five genes (indicated by bold type in Table 5) were found in the genes regulated following treatment with the mixture only (Table 2). Nine other genes are common to the list of genes whose expression is altered following exposure to TCDD alone and the mixture (* in Table 5) or to α -endosulfan alone and the mixture (CYP 2E1, see Table 3). Finally, 3 genes (^{\$} in Table 5) are found on the list of genes that were found to be altered by exposure to all 3 treatments (Table 4). Since the expression of the remaining 3 genes of the Focus list varied less than 2-fold, they were not present in the stringent analysis. The results of the Focus analysis were, thus, in good agreement with the more stringent analysis used to identify genes that discriminate the effect of exposure to the mixture from that of exposure to a unique POP.

Hierarchical clustering (HC) analysis of the Focus scores of the differentially expressed genes demonstrates that the gene expression profile for HepaRG cells exposed to the mixture of pollutants clusters with that of cells exposed to TCDD alone in agreement with the PCA analysis. The HC analysis also shows that large clusters of genes are more strongly

up-regulated (Figure 3A, intense red color) or down-regulated (Figure 3B, deep blue color) in cells following exposure to the mixture as compared to exposure to a single POP.

Correlation between the microarray, RT-qPCR and immunoblotting technologies

Reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used as an independent, confirmatory, technique to evaluate the expression of a subset of the genes found to be differentially expressed by global genome expression analysis. We measured the expression of 30 genes, 11 up-regulated genes and 19 down-regulated. These genes, taken together, exhibit a large range of fold changes, as assessed by whole genome analysis, following exposure of cells to the mixture of the POPs or to dioxin and α -endosulfan alone (Table 6). The values for the expression of the genes obtained by microarray analysis and RT-qPCR are highly correlated ($R^2 = 0.97, 0.90$ and 0.97 for treatment by TCDD alone, α -endosulfan alone or the mixture, respectively, Figure 4) suggesting that the global gene results are trustworthy.

To determine whether exposure to lower concentrations of the POP mixture for longer periods of time exhibited the same effects, we exposed HepaRG cells for 8 days to 5 to 125-fold lower concentrations of TCDD (0.2nM to 5nM) and a 10-fold lower concentration of α -endosulfan (1 μ M) and to mixtures of POPs composed of 5 to 125-fold lower concentrations of TCDD (0.2nM to 5nM) and a 10-fold lower concentration of α -endosulfan (1 μ M) (Figure 5A). We examined the expression of two genes whose expression was severely downregulated initially ADH1B and G6PC. ADH1B gene expression remained markedly decreased at 5-fold lower concentrations of TCDD (5nM) and G6PC gene expression was still significantly decreased at 125-fold lower concentrations (0.2nm TCDD). Although a

concentration of 1 μ M α -endosulfan did not affect the expression of either ADH1B or G6PC, the expression of G6PC was significantly decreased by 3 μ M α -endosulfan (Figure S2). Similarly to the effect observed in the transcriptome analysis, the mixture of the POPs decreased the expression of both genes significantly more as compared to the effect of TCDD alone. For both G6PC and ADH1B, this effect occurred at concentrations as low as 1nM TCDD plus 1 μ M α -endosulfan (Figure 5A). Alteration in the expression of the gene may be followed by an effect on the level of the protein present in the cells, as shown by the decrease in the amount of ADH1 (Figure 5B, Figure S3), after 3 days of exposure to the POPs (25nM TCDD plus 10 μ M α -endosulfan).

Pathways regulated by the mixture of TCDD and α -endosulfan

To further elucidate the effects on hepatocyte function following exposure of HepaRG cells to the combination of the two pollutants, we used Ingenuity Pathway Analysis (IPA) to assign the biological pathways altered by the different treatments. The 4 top network functions associated with the genes regulated by the mixture of TCDD and α -endosulfan using the Focus analysis were: i) RNA post-transcriptional modification, genetic disorder, lipid metabolism; ii) cancer, gastrointestinal disease, genetic disorder; iii) molecular transport, RNA trafficking, cell cycle; iv) small molecule biochemistry, DNA replication, recombination, repair, cell cycle. The lipid metabolism, small molecule biochemistry and molecular transport networks were the top networks associated with genes that were down-regulated whereas the other key words were mostly associated with up-regulated genes. The associated canonical pathways are given in Table 7. The farnesoid X receptor/retinoid X receptor (FXR/RXR), bile acid biosynthesis and glycerolipid metabolism pathway genes were down-regulated, as were genes in the glycolysis/gluconeogenesis pathway. The top down-regulated network by the mixture of TCDD and α -endosulfan (as well as the top

molecular and cellular functions network), “lipid metabolism”, derived by the Ingenuity network analysis ($p < 0.00001$) contains the genes shown in Table 8. Only the 11 genes exhibiting at least a two-fold change as compared to the control are shown in the table although another set of 13 genes belonging to the same network was also derived from the Ingenuity analysis with a cutoff of 1.2 for the fold change. For all of these genes, TCDD and α -endosulfan exert their effects in the same direction without any evidence of inhibitory cross-talk.

The pathways related to cancer and control of the cell cycle, as well as the AhR signalling pathway, were up-regulated. The GTPase RAN (Ras-related nuclear protein) signalling pathway was also up-regulated. RAN is involved in cell differentiation and transformation, as it acts on the assembly of the mitotic apparatus and in nuclear protein import/export and its overexpression is linked to a poor prognosis in cancer [79].

There is no other published study on whole genome expression using TCDD and α -endosulfan with which we can compare our results and thus the information provided here is novel. We, thus, compared our results following exposure of HepaRG to TCDD or α -endosulfan alone with results published in the literature. None of the studies employ conditions that are identical to our work, but a similar study evaluated the effect of exposure of HepaRG cells to 10 nM TCDD or 30 μ M 17 β -estradiol for 12 or 48 hours [42] and two other analyses employed primary human hepatocytes exposed to several concentrations of TCDD for different times [53, 58]. Several of the up- and down-regulated gene sets derived from these studies were enriched in the most strongly up- and down-regulated genes in our own ranked list when analyzed by the gene set enrichment analysis algorithm (Figure 6). For the only study employing 17 β -estradiol [42], the down-regulated gene sets for both the 12 and 48 hour treatments with 30 μ M 17 β -estradiol and the up-regulated gene set for the 12 hour treatment were enriched in the down- and up-regulated genes of our ranked list with

FDRq (false discovery rate) $< 1 \times 10^{-5}$ and FWER (family wise error rate according to Benjamini and Hochberg [77]) $< 1 \times 10^{-4}$. Rank rank hypergeometric overlap also identified statistically significant overlap between the expression signatures found by Jennen et al. [42] for 17 β -estradiol (both 12 and 48 hour treatments) and our own for α -endosulfan (see Figure 6 for representative GSEA curves and Rank Rank Hypergeometric heat maps). For TCDD, most enrichment was found (based on the normalized enrichment scores) for the up and down-regulated gene sets of Jennen et al. [42] following exposure of HepaRG to 10nM TCDD for 12 or 48 hours. Significant enrichment was also found for the up- and down-regulated sets of Forgacs et al. [58] following exposure of primary hepatocytes to 10nM TCDD for 12 and 48 hours as well as the the up-regulated gene set for exposure for 24 hours. Less significant enrichment was found for the gene set of up-regulated genes of Carlson et al. [53] following exposure of primary hepatocytes to 10nM TCDD. However, for these gene sets, the FDRq was $< 1 \times 10^{-5}$ and the FWER was $< 1 \times 10^{-4}$ (see Figure 6 for representative GSEA curves and rank rank hypergeometric heat maps).

Finally, we compared the lists of genes that were differentially regulated by treatment with TCDD alone in our samples with those of a microarray study performed on primary mouse hepatocytes [55]. We used Focus to rank genes according to their degree of differential expression between treatments with TCDD versus the vehicle (0.15% DMSO). Although the lists of genes that were most strongly up- and down-regulated by TCDD in the mouse hepatocytes mapped among the most strongly up- and down-regulated genes in our ranked list, when analyzed by the Gene Set Enrichment Analysis algorithm (GSEA, $p < 0.001$; data not shown), the FDR and FWER values were not as significant as for the gene sets from the HepaRG cell lines or the primary human hepatocytes.

Taken together, the results attest to common effects of exposure to TCDD in the HepaRG cell lines and some primary human hepatocytes which are shared to a lesser extent with mouse primary hepatocytes.

Discussion

Elucidation of the mechanisms by which mixtures of compounds, which act via different pathways or xenosensors, can affect cell function may be useful for further understanding how toxicants interact and how these interactions might affect toxicity. However, as concerns human hepatotoxicity, there is no one model system that is ideal for elucidating these mechanisms. Epidemiological studies may be incomplete as to exposure, may have small numbers of participants which limit the power of the statistical analyses for detection of effects, may have concomitant exposures to other factors, chemical or other that may have effects and, finally, may involve extrapolations over long periods of time that may lead to considerable errors in estimations of initial exposure. *In vivo* animal models are limited by the differences that exist between animals and humans (species specific differences in thalidomide [80] or PPARalpha function (references [81] and [82] describe two types of important examples, see also [83]) and by the difficulty in extrapolating effects found in animals to humans [83, 84].

Primary cultures or permanent cell lines, *in vitro*, are not exposed to the local factors derived from the organ or to factors originating at a distance in the organism. Nevertheless, *in vitro* studies present advantages for studying cell type specific mechanisms and have been promoted by regulatory agencies as alternatives to animal studies [84, 85] and transcriptomics has proven useful in identifying pathways perturbed by toxicants [86]. However, species specific differences exist between animal and human primary hepatocyte cultures [53] or between animal and human established cell lines [63]. Further, human

primary cultures exhibit variability due to differences in the donors with respect to genetics [87], demographics, disease and drug therapies [88-90] and this variability may be manifest following xenobiotic exposure [91]. Finally, there may also be differences in the response to toxicants between human primary hepatocytes and established human hepatic cell lines [92-94] or among established human hepatocyte cell lines [42, 54, 95].

In this study, we have used a human liver-derived cell line, HepaRG, to provide novel information concerning the effects on hepatocyte function of a mixture of POPs that exert their effects via different xenosensors. TCDD, which binds to the AhR, and α -endosulfan, which acts via the ER and/or PXR signalling pathways, were chosen because they both accumulate in the liver in animals and humans, they are suspected of having non-carcinogenic hepatic toxicity and there is knowledge of their effects individually (at least for TCDD) that may help to understand the effects of the mixture. The concentrations that were employed maximize the activation of the corresponding signalling pathways without leading to overt toxicity during the course of the experiment.

To our knowledge, this is the first genome-wide study in a human hepatic cell model of the effects of α -endosulfan alone or in combination with TCDD thus providing novel information on the modulation of global gene expression by the ER and/or PXR xenosensors alone and in combination with the AhR. The results demonstrate that, for the most part, the effects of TCDD and α -endosulfan on HepaRG hepatocytes are uncorrelated, which is consistent with these compounds exerting their effects by different mechanisms (pathways). However, it is also clear that the combined effects of α -endosulfan and TCDD are greater than those of each POP alone. Thus, for concentrations at which TCDD or α -endosulfan, individually, do not alter gene expression significantly, the mixture does produce a significant modification in the expression of 100 genes, although it should be emphasized that no conclusions can be made regarding the additivity or synergy of effects given that only a

single concentration of each pollutant was studied. Further, although inspection of Table 2 reveals that many genes appear to exhibit some modulation in the level of their expression after treatment with one pollutant, these changes are not significant given the stringency of the statistical analysis and the low level of expression of those genes in many cases. This may illustrate the delicacy of establishing zero-effect levels.

We also found evidence for what appears to be selective inhibitory crosstalk within the AhR and ER/PXR pathways. TCDD, in the mixture, inhibited the effects of α -endosulfan on the expression of 10 genes and α -endosulfan inhibited the effects of TCDD on 21 genes (6 and 5 genes, respectively, under more stringent conditions) (Table 2). Serine dehydratase, the expression of which is affected by both TCDD and α -endosulfan, but not the mixture, may be added to these ensembles although the mechanisms may not be the same. Several mechanisms for inhibitory AhR-ER α cross-talk, which may be gene/response and cell-context dependent, have been derived from the study of rodent uterus, rodent mammary tumors, breast, ovarian and endometrial cancer cell lines [96-98]. These include 1) competition for co-factors (ARNT and others), 2) competition for promoter binding via inhibitory DREs (dioxin responsive elements), 3) regulation of estradiol synthesis and metabolism, 4) increased proteasomal degradation of the ER, 5) ER induced DNA methylation of AhR response elements and 6) TCDD induced expression of inhibitory factors of estradiol-induced genes. Our observations would appear to be novel for a human hepatic-derived cell line and the genes identified, if validated, might be useful targets to further understand these negative mechanisms of regulation in the liver.

Our investigation further revealed that the response to the mixture of these endocrine disruptors involves both increases and decreases in the expression of many genes which belong to several pathways. However, the drastic down-regulation of genes involved in several metabolic pathways, such as lipid metabolism, which is the top network for down-

regulated genes, is particularly striking. mRNA expression is almost abolished for some of the genes by the mixture. Indeed, some genes, which were not identified as targets after treatment by a single pollutant because the fold change in their expression was below the cut off, are identified following treatment by the combination of pollutants as a result of a significant change in their expression.

Among the genes belonging to the lipid metabolism network (See Table 8) is ADH4, a member of the alcohol dehydrogenase family, which is organized as a cluster on chromosome 4 (ADH1A, B, C, ADH4 and ADH6). Interestingly, the drastic down-regulation of the expression of several of these ADHs has been linked to increased aggressiveness and a lower survival rate in breast, liver or lung cancer [99, 100]. The expression of these genes, as well as those of RDH16 (retinol dehydrogenase) and CYP2E1, all of which metabolize ethanol and/or retinoids, was decreased 70 to 80% in HepaRG cells exposed to both pollutants. In contrast, they were only moderately down-regulated in cells exposed to either pollutant alone. These changes in the level of mRNA were paralleled by changes in the amount of protein as shown for ADH1. Moreover, we observed a similar type of regulation using lower concentrations of pollutants and a longer time of exposure.

The members of the alcohol dehydrogenase family metabolize a wide variety of substrates such as ethanol and vitamin A, various aliphatic alcohols and lipid peroxydation products. ADH1 A, B, C (Class I) are involved particularly in ethanol metabolism whereas ADH4 (Class II) preferentially metabolizes retinol, although it contributes to up to 40% of the ethanol oxidation rate at intoxicating levels of alcohol [101]. Several studies have shown clearly that dioxins, through the AhR, disturb retinoid homeostasis, in particular by decreasing hepatic vitamin A and by increasing oxidation of the retinoids [102]. A few studies suggest a role for other pollutants, such as pesticides, in the deregulation of retinoid homeostasis [103]. Decreased expression of Class I ADH in the liver of male Wistar rats

treated by PCB 126, an AhR ligand, has been described [104] whereas an increase in the expression of ADH1 A by exposure to TCDD has been reported in HepG2 cells [105]. The discrepancy between the latter result and our own may result from the difference in cellular models. Since many studies on pollutant mixtures use animals, it is instructive to compare these results with those derived from models for humans such as the HepaRG cell line. A recent study has compared the effect of TCDD on gene expression on primary hepatocytes in three species and underlined species-specific effects for this toxicant with respect to metabolism [58]. Although the conclusion was that human lipid metabolism resembled more closely that of the mouse rather than that of the rat, the authors also showed that repression of ADH1C is observed in human and rat hepatocytes but not in the mouse model, in accordance with our findings on ADHs in the HepaRG model. Overall, our results show significant overlap between the HepaRG model and primary human hepatocytes and somewhat less significant overlap with mouse primary hepatocytes.

The drastic down-regulation, up to 80%, of the expression of the alcohol dehydrogenase gene family by the combination of dioxin and α -endosulfan could thus exacerbate the modulation of vitamin A content and retinoic acid production induced by a single pollutant in the liver, thus further affecting signalling through the RAR-RXR pathway. In fact, hepatic vitamin A depletion in rodent models after treatment with TCDD has been linked to CYP1A1 induction and increased metabolism of this nutrient [106]. It has been suggested that alteration of retinoid metabolism could play a role in the wasting syndrome associated with dioxin exposure [61]. Our results also suggest that the almost complete inhibition of the expression of several enzymes involved in retinoid and/or alcohol metabolism by the combination of TCDD and α -endosulfan may profoundly alter the homeostasis of vitamin A and impair the protective role of retinoic acids in cancer, aging or immuno-stimulation.

The combination of pollutants also inhibited the genes for several enzymes which belong to the FXR/RXR axis, which plays a role in bile acid signalling. The expression of a key enzyme involved in bile acid biosynthesis from cholesterol (CYP7A1) was down-regulated by 80%, following treatment with the mixture of POPs (Table 8). TCDD also decreased CYP7A1 expression in a rat liver model [61]. The expression of the canalicular half-transporters ABCG5/G8, which associate at the plasma membrane to control the excretion of excess cholesterol from the liver, was inhibited by 70% following treatment with the combination of pollutants (Table 8). Thus, the down-regulation of these genes may contribute to increased cellular cholesterol and contribute along with other factors to the development of the metabolic syndrome [107]. Several epidemiological studies indicate an association between obesity and the metabolic syndrome and the concentration of POPs in serum [4, 6, 108] and our results concerning the effects on hepatocyte gene expression are consistent with these studies.

The treatment of the cells with the mixture of POPs led to an 80% decrease in expression of the gene encoding hydroxyacid oxidase 2 (HAO2), a peroxisomal enzyme involved in the oxidation of fatty acids and carbamoyl-phosphate synthetase 1 (CPS1), the first enzyme in the urea cycle (Table 8). Interestingly, these genes were reported as down-regulated in human hepatocellular carcinoma [109]. We found that the mixture resulted in a 90% decrease in expression of the gene for the liver catalytic subunit of glucose 6 phosphatase (G6PC). G6PC is the final enzyme in gluconeogenesis and glycogenolysis which provides energy and controls the serum glucose level in the blood during fasting. These results are in line with the 50% decrease in the expression of G6PC that is observed in both the human hepatoma cell line HuH7 treated with the PXR agonist rifampicin [110] and in chick embryo hepatocytes treated with TCDD [111]. We also observed decreases in the expression of PON 1, which plays a role in lipid metabolism as a part of the high density

lipoprotein (HDL) particles as well as in the hydrolysis of organophosphate poisons, and of UGT2B17, which plays a role in xenobiotic detoxification in the liver (Table 8).

Finally, exposure to numerous pollutants is often associated with an increase in cancer [112] and the up-regulation of the genes involved in AhR signalling, the molecular mechanisms of cancer and cell cycle checkpoint control that we observe is consistent with these studies.

In the future, comparison of acute and “chronic” exposures to lower pollutant concentrations will be important. The HepaRG cell line is a human model of choice for studying such sub-chronic treatments since the differentiated cells stably express (for two weeks at least) several CYPs and receptors for xenobiotics [39]. Our results here obtained with an 8-day treatment with low doses of TCDD and α -endosulfan indicate that low doses over longer periods of time can lead to changes in gene expression similar to those obtained with an acute treatment at higher concentrations of POPs.

Epidemiological studies have associated chronic exposure to low levels of POPs with metabolic disorders such as insulin resistance or disruption of lipid metabolism [108, 113, 114]. Interestingly, a number of genes down-regulated in our study by α -endosulfan were also down-regulated by 17 β -estradiol in the study by Jennen and co-workers [42]. These findings emphasize that deleterious hepatocellular effects may be more pronounced with a mixture of POPs which act through different signalling pathways. We are currently investigating the effects of the mixture on a number of metabolic pathways down-regulated in the study and deciphering which receptors are involved in these effects.

With respect to the effects of TCDD, although manifestations of hepatotoxicity (hepatocellular tumors, cytoplasmic vacuolization, multinucleate hepatocytes, inflammation, steatosis, necrosis) have been noted [115-117] in several laboratory animals (mouse, rat, chicken, guinea pig, rabbit, zebra fish), the United States Environmental Protection Agency

in its reanalysis of key issues related to dioxin toxicity [23] noted that “hepatic effects were evident in virtually all rodent studies that looked for them and are often severe, although not evident in humans”. Further, it is not clear whether toxicant-associated steatohepatitis develops in humans exposed to TCDD [118] and although there appears to be an association between dioxin and type 2 diabetes a causal link is not necessarily implied [5, 10, 119, 120]. Continued investigation in a variety of model systems clearly seems warranted to further elucidate the mechanisms of action of these pollutants in humans.

In conclusion, this study provides novel information on the effects on global gene expression of a mixture of environmental POPs, as compared to each one individually, in a human liver-derived model and, in particular, on the down-regulation of genes involved in metabolic pathways. It also demonstrates that in spite of their effects being largely uncorrelated, TCDD and α -endosulfan act together to affect the expression of a significant number of genes by several different mechanisms. Finally, the study provides novel information concerning the usefulness of the HepaRG cell line as a model system for studying human hepatocyte specific xenobiotic effects.

634 **Acknowledgments**

635 We thank Mrs D. Glaise for her help with the HepaRG cell culture, Dr L. Aggerbeck
636 and Dr E. Blanc for critical reading of the manuscript and F. Dumont for help with the
637 bioinformatics.

638

639

References

1. White SS, Birnbaum LS (2009) An overview of the effects of dioxins and dioxin-like compounds on vertebrates, as documented in human and ecological epidemiology. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 27:197-211.
2. Rochester JR (2013) Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reprod Toxicol* 42:132-155.
3. Alavanja MC, Hoppin JA, Kamel F (2004) Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. *Annu Rev Public Health* 25:155-197.
4. Lee DH, Steffes MW, Sjodin A, Jones RS, Needham LL, et al. (2011) Low dose organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls predict obesity, dyslipidemia, and insulin resistance among people free of diabetes. *PLoS One* 6:e15977.
5. Lee DH, Porta M, Jacobs DR Jr, Vandenberg LN (2014) Chlorinated persistent organic pollutants, obesity, and type 2 diabetes. *Endocr Rev* 35:557-601.
6. Lim S, Cho YM, Park KS, Lee HK (2010) Persistent organic pollutants, mitochondrial dysfunction, and metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1201:166-76.
7. Thayer K, Heindel JJ, Bucher JR, Gallo MA (2012) Role of environmental chemicals in diabetes and obesity : A National Toxicology Program Workshop Review. *Environ Health Perspect* 120:779-789.
8. Kamel F (2013) Epidemiology. Paths from pesticides to Parkinson's. *Science* 341:722-723.
9. Warner, M, Mocarelli, P, Brambilla, P, Wesselink, A, Samuels, S, et al. (2013) Diabetes, metabolic syndrome and obesity in relation to serum dioxin concentrations : The Seveso Women's Health Study. *Environ Health Perspect* 121:906-911.
10. Magliano DJ, Loh VH, Harding JL, Botton J, Shaw JE (2014) Persistent organic pollutants and diabetes: a review of the epidemiological evidence. *Diabetes Metab* 40:1-14.
11. Loeffler IK, Peterson RE (1999) Interactive effects of TCDD and p,p'-DDE on male reproductive tract development in in utero and lactationally exposed rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 154:28-39.
12. Coumoul X, Diry M, Robillot C, Barouki R (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.
13. Perobelli JE, Martinez MF, da Silva Franchi CA, Fernandez CD, de Camargo JL, et al. (2010) Decreased sperm motility in rats orally exposed to single or mixed pesticides. *J Toxicol Environ Health A* 73:991-1002.
14. Rana I, Shivanandappa T (2010) Mechanism of potentiation of endosulfan cytotoxicity by thiram in Ehrlich ascites tumor cells. *Toxicol In Vitro* 24:40-44.
15. Kopec AK, D'Souza ML, Mets BD, Burgoon LD, Reese SE, et al. (2011) Non-additive hepatic gene expression elicited by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB153) co-treatment in C57BL/6 mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 256:154-167.
16. Evans RM, Scholze M, Kortenkamp A (2012) Additive mixture effects of estrogenic chemicals in human cell-based assays can be influenced by inclusion of chemicals with differing effect profiles. *PLoS One* 7:e43606.

17. Nawaz A, Razpotnik A, Rouimi P, de Sousa G, Cravedi JP, et al. (2014) Cellular impact of combinations of endosulfan, atrazine, and chlorpyrifos on human primary hepatocytes and HepaRG cells after short and chronic exposures. *Cell Biol Toxicol* 30:17-29.
18. Savary CC, Josse R, Guillet F, Bruyere A, Robin MA, et al. (2014) Interactions of Endosulfan and Methoxychlor Involving CYP3A4 and CYP2B6 in Human HepaRG Cells. *Drug Metab Dispos* May 15. pii: dmd.114.057786. [Epub ahead of print]
19. Kortenkamp A (2007) Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environ Health Perspect* 115 Suppl 1:98-105.
20. Kortenkamp A, Faust M, Scholze M, Backhaus T (2007) Low-level exposure to multiple chemicals: reason for human health concerns? *Environ Health Perspect* 115 Suppl 1:106-114.
21. U.S. EPA Environmental Protection Agency (2002) Environmental Fate and Ecological Risk Assessment for the Reregistration Eligibility Decision on Endosulfan (Thiodan). DP Barcode D238673; U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, Environmental Fate and Effects Division, Washington, DC; 224 pp.
22. U.S. EPA Environmental Protection Agency (2007) RED (Re-registration Eligibility Decision), document: endosulfan updated risk assessments, notice of availability, and solicitation of usage information. Federal Register U.S. Environmental Protection Agency; 64624-6; Docket: EPA-HQ-OPP-2002-0262.
23. U. S. EPA Environmental Protection Agency (2012) EPA's Reanalysis of Key Issues Related to Dioxin Toxicity and Response to NAS Comments, Volume 1 (CAS No. 1746-01-6) EPA/600/R-10/038F U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
24. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (2013) Toxicological profile for endosulfan. (Draft for Public Comment) Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
25. Coumoul X, Diry M, Barouki R (2002) PXR-dependent induction of human CYP3A4 gene expression by organochlorine pesticides. *Biochem Pharmacol* 64:1513-1519.
26. Casabar RC, Das PC, Dekrey GK, Gardiner CS, Cao Y, et al. (2010) Endosulfan induces CYP2B6 and CYP3A4 by activating the pregnane X receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* 245:335-343.
27. Lemaire G, Mnif W, Mauvais P, Balaguer P, Rahmani R (2006) Activation of alpha- and beta-estrogen receptors by persistent pesticides in reporter cell lines. *Life Sci* 79:1160-1169.
28. Dorough, HW, Huhtanen, K, Marshall, TC, Bryant, HE (1978) Fate of Endosulfan in Rats and Toxicological Considerations of Apolar Metabolites. *Pestic Biochem Physiol* 8: 241-252.
29. Caride A, Lafuente A, Cabaleiro T (2010) Endosulfan effects on pituitary hormone and both nitrosative and oxidative stress in pubertal male rats. *Toxicol Lett* 197:106-112.
30. Mrema EJ, Rubino FM, Brambilla G, Moretto A, Tsatsakis AM, et al. (2013) Persistent organochlorinated pesticides and mechanisms of their toxicity. *Toxicology* 307:74-88.
31. Kumar GK, Klein JB (1985) Analysis of expression and posttranslational modification of proteins during hypoxia. *J Appl Physiol* 196:1178-1186; discussion 1170-1172.

32. Yoshida R, Ogawa Y (2000) Oxidative stress induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: an application of oxidative stress markers to cancer risk assessment of dioxins. *Ind Health* 38:5-14.
33. Zappulla D (2008) Environmental stress, erythrocyte dysfunctions, inflammation, and the metabolic syndrome: adaptations to CO₂ increases? *J Cardiometab Syndr* 3:30-34.
34. Lang F, Gulbins E, Lang PA, Zappulla D, Föller M (2010) Ceramide in suicidal death of erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 26:21-28.
35. Khan, KH (2012) Impact of endosulfan on living beings. *International Journal of Biosciences* 2:9-17.
36. Trayhurn P (2014) Hypoxia and adipocyte physiology: implications for adipose tissue dysfunction in obesity. *Annu Rev Nutr* 34:207-236.
37. Moon JM, Chun BJ (2009) Acute endosulfan poisoning: a retrospective study. *Hum Exp Toxicol* 28:309-316.
38. Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, Glaise D, Morel F, et al. (2007) The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem Biol Interact* 168:66-73.
39. Antherieu S, Chesne C, Li R, Camus S, Lahoz A, et al. (2010) Stable expression, activity, and inducibility of cytochromes P450 in differentiated HepaRG cells. *Drug Metab Dispos* 38:516-525.
40. Hart SN, Li Y, Nakamoto K, Subileau EA, Steen D, et al. (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.
41. Xu JJ, Diaz D, O'Brien PJ (2004) Applications of cytotoxicity assays and pre-lethal mechanistic assays for assessment of human hepatotoxicity potential. *Chem Biol Interact* 150:115-128.
42. Jennen DG, Magkoufopoulou C, Ketelslegers HB, van Herwijnen MH, Kleinjans JC, et al. (2010) Comparison of HepG2 and HepaRG by whole-genome gene expression analysis for the purpose of chemical hazard identification. *Toxicol Sci* 115:66-79.
43. Gerets HH, Tilmant K, Gerin B, Chanteux H, Depelchin BO, et al. (2012) Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biol Toxicol* 28:69-87.
44. Kanebratt KP, Andersson TB. (2008) Evaluation of HepaRG cells as an in-vitro model for human drug metabolism studies. *Drug Metab Dispos* 36:1444-1452.
45. Lübberstedt M, Müller-Vieira U, Mayer M, Biemel KM, Knöspel F, et al. (2011) HepaRG human hepatic cell line utility as a surrogate for primary human hepatocytes in drug metabolism assessment in vitro. *J Pharmacol Toxicol Methods* 63:59-68.
46. Kotani N, Maeda K, Debori Y, Camus S, Li R, et al. (2012) Expression and transport function of drug uptake transporters in differentiated HepaRG cells. *Mol Pharm* 9:3434-3441.
47. Rogue A, Lambert C, Spire C, Claude N, Guillouzo A (2012) Interindividual variability in gene expression profiles in human hepatocytes and comparison with HepaRG cells. *Drug Metab Dispos* 40:151-158.
48. Samanez CH, Caron S, Briand O, Dehondt H, Duplan I, et al. (2012) The human hepatocyte cell lines IHH and HepaRG: models to study glucose, lipid and lipoprotein metabolism. *Arch Physiol Biochem* 118:102-111.
49. Guillouzo A, Morel F, Fardel O, Meunier B (1993) Use of human hepatocyte cultures for drug metabolism studies. *Toxicology* 82:209-219.

- 784 50. Madan A, Graham RA, Carroll KM, Mudra DR, Burton LA, et al. (2003) Effects of
785 prototypical microsomal enzyme inducers on cytochrome P450 expression in cultured
786 human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 31:421-431.
- 787 51. Lambert CB, Spire C, Claude N, Guillouzo A (2009) Dose- and time-dependent
788 effects of phenobarbital on gene expression profiling in human hepatoma HepaRG
789 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 234:345-360.
- 790 52. Godoy P, Hengstler JG, Ilkavets I, Meyer C, Bachmann A, et al. (2009) Extracellular
791 matrix modulates sensitivity of hepatocytes to fibroblastoid dedifferentiation and
792 transforming growth factor beta-induced apoptosis. *Hepatology* 49:2031-2043.
- 793 53. Carlson EA, McCulloch C, Koganti A, Goodwin SB, Sutter TR, et al. (2009)
794 Divergent transcriptomic responses to aryl hydrocarbon receptor agonists between rat
795 and human primary hepatocytes. *Toxicol Sci* 112:257-272.
- 796 54. Kim S, Dere E, Burgoon LD, Chang CC, Zacharewski TR (2009) Comparative
797 analysis of AhR-mediated TCDD-elicited gene expression in human liver adult stem
798 cells. *Toxicol Sci* 112:229-244.
- 799 55. Flaveny CA, Murray IA, Perdew GH (2010) Differential gene regulation by the
800 human and mouse aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol Sci* 114:217-225.
- 801 56. Dere E, Lee AW, Burgoon LD, Zacharewski TR (2011) Differences in TCDD-elicited
802 gene expression profiles in human HepG2, mouse Hepa1c1c7 and rat H4IIE hepatoma
803 cells. *BMC Genomics* 12:193.
- 804 57. Black MB, Budinsky RA, Dombkowski A, Cukovic D, LeCluyse EL, et al. (2012)
805 Cross-species comparisons of transcriptomic alterations in human and rat primary
806 hepatocytes exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Sci* 127:199-215.
- 807 58. Forgacs AL, Dere E, Angrish MM, Zacharewski TR (2013) Comparative Analysis of
808 Temporal and Dose-Dependent TCDD-Elicited Gene Expression in Human, Mouse,
809 and Rat Primary Hepatocytes. *Toxicol Sci* 133:54-66.
- 810 59. Boverhof DR, Burgoon LD, Tashiro C, Chittim B, Harkema JR, et al. (2005)
811 Temporal and dose-dependent hepatic gene expression patterns in mice provide new
812 insights into TCDD-Mediated hepatotoxicity. *Toxicol Sci* 85:1048-1063.
- 813 60. Boverhof DR, Burgoon LD, Tashiro C, Sharratt B, Chittim B, et al. (2006)
814 Comparative toxicogenomic analysis of the hepatotoxic effects of TCDD in Sprague
815 Dawley rats and C57BL/6 mice. *Toxicol Sci* 94:398-416.
- 816 61. Fletcher N, Wahlstrom D, Lundberg R, Nilsson CB, Nilsson KC, et al. (2005) 2,3,7,8-
817 Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters the mRNA expression of critical genes
818 associated with cholesterol metabolism, bile acid biosynthesis, and bile transport in
819 rat liver: a microarray study. *Toxicol Appl Pharmacol* 207:1-24.
- 820 62. Dere E, Boverhof DR, Burgoon LD, Zacharewski TR (2006) In vivo-in vitro
821 toxicogenomic comparison of TCDD-elicited gene expression in Hepa1c1c7 mouse
822 hepatoma cells and C57BL/6 hepatic tissue. *BMC Genomics* 7:80.
- 823 63. Dere E, Lo R, Celius T, Matthews J, Zacharewski TR (2011) Integration of genome-
824 wide computation DRE search, AhR ChIP-chip and gene expression analyses of
825 TCDD-elicited responses in the mouse liver. *BMC Genomics* 12:365.
- 826 64. Boutros PC, Yan R, Moffat ID, Pohjanvirta R, Okey AB (2008) Transcriptomic
827 responses to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in liver: comparison of rat
828 and mouse. *BMC Genomics* 9:419.
- 829 65. Yao CQ, Prokopec SD, Watson JD, Pang R, P'ng C, et al. (2012) Inter-strain
830 heterogeneity in rat hepatic transcriptomic responses to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-
831 dioxin (TCDD). *Toxicol Appl Pharmacol* 260:135-145.
- 832 66. Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaize D, et al. (2002) Infection of a human
833 hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15655-15660.

67. Aninat C, Piton A, Glaise D, Le Charpentier T, Langouet S, et al. (2006) Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos* 34:75-83.
68. Bui LC, Tomkiewicz C, Chevallier A, Pierre S, Bats AS, et al. (2009) Nedd9/Hef1/Cas-L mediates the effects of environmental pollutants on cell migration and plasticity. *Oncogene* 28:3642-3651.
69. Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, et al. (2005) Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res* 33:e56.
70. Cole SW, Galic Z, Zack JA (2003) Controlling false-negative errors in microarray differential expression analysis: a PRIM approach. *Bioinformatics* 19:1808-1816.
71. Garcia-Ortiz JE, Pelosi E, Omari S, Nedorezov T, Piao Y, et al. (2009) Foxl2 functions in sex determination and histogenesis throughout mouse ovary development. *BMC Dev Biol* 9:36.
72. Reich M, Liefeld T, Gould J, Lerner J, Tamayo P, et al. (2006) GenePattern 2.0. *Nature Genetics* 38:500-501.
73. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, et al. (2003) PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 34:267-73.
74. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, et al. (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15545-15550.
75. Plaisier SB, Taschereau R, Wong JA, Graeber TG (2010) Rank-rank hypergeometric overlap: identification of statistically significant overlap between gene-expression signatures. *Nucleic Acids Res* 38:e169.
76. Beaton, AE, Tukey, JW (1974) The fitting of power series, meaning polynomials, illustrated on band-spectroscopic data. *Technometrics* 16:147-185.
77. Benjamini, Y, Hochberg, Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B (Methodological)* 57:289-300.
78. Micallef L, Rodgers P (2014) eulerAPE: Drawing area-proportional 3-Venn diagrams using ellipses. *PLoS One* 9:e101717.
79. Ly TK, Wang J, Pereira R, Rojas KS, Peng X, et al. (2010) Activation of the Ran GTPase is subject to growth factor regulation and can give rise to cellular transformation. *J Biol Chem* 285:5815-5826.
80. Nau, H (1986) Species differences in pharmacokinetics and drug teratogenesis. *Environ Health Perspect* 70: 113–129.
81. Lalloyer F, Staels B (2010) Fibrates, glitazones, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:894-899.
82. Kim S, Kiyosawa N, Burgoon LD, Chang CC, Zacharewski TR (2013) PPAR α -mediated responses in human adult liver stem cells: In vivo/in vitro and cross-species comparisons. *J Steroid Biochem Mol Biol* 138:236-247.
83. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, et al. (2013) Inflammation and Host Response to Injury, Large Scale Collaborative Research Program : Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:3507-3512.
84. National Research Council. (2007). Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy. National Research Council Committee on Toxicity Testing and Assessment of Environmental Agents, The National Academies Press, Washington, DC. Available at: http://www.nap.edu/catalog.php?record_id%411970.

85. Organization for economic cooperation and development. (2011) Report of the workshop on using mechanistic information in forming chemical categories (no. 138, series on testing and assessment). OECD, Crystal City.
86. Jennings P, Limonciel A, Felice L, Leonard MO (2013) An overview of transcriptional regulation in response to toxicological insult. *Arch Toxicol* 87:49-72.
87. Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE (2002) Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev* 54:1271-1294.
88. Slatter JG, Templeton IE, Castle JC, Kulkarni A, Rushmore TH, et al. (2006) Compendium of gene expression profiles comprising a baseline model of the human liver drug metabolism transcriptome. *Xenobiotica* 36:938-962.
89. Villeneuve JP, Pichette V (2004) Cytochrome P450 and liver diseases. *Curr Drug Metab* 5:273-282.
90. Yang L, Price ET, Chang CW, Li Y, Huang Y, et al. (2013) Gene expression variability in human hepatic drug metabolizing enzymes and transporters. *PLoS One* 8:e60368.
91. Goyak KM, Johnson MC, Strom SC, Omiecinski CJ (2008) Expression profiling of interindividual variability following xenobiotic exposures in primary human hepatocyte cultures. *Toxicol Appl Pharmacol* 231:216-224.
92. Guo L, Dial S, Shi L, Branham W, Liu J, et al. (2011) Similarities and differences in the expression of drug-metabolizing enzymes between human hepatic cell lines and primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 39:528-538.
93. Sjogren AK, Liljevald M, Glinghammar B, Sagemark J, Li XQ, et al. (2014) Critical differences in toxicity mechanisms in induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes, hepatic cell lines and primary hepatocytes. *Arch Toxicol* 88:1427-1437.
94. Vrba J, Havlikova M, Gerhardova D, Ulrichova J (2014) Palmatine activates AhR and upregulates CYP1A activity in HepG2 cells but not in human hepatocytes. *Toxicol In Vitro* 28:693-699.
95. Kim WK, In YJ, Kim JH, Cho HJ, Kim JH, et al. (2006) Quantitative relationship of dioxin-responsive gene expression to dioxin response element in Hep3B and HepG2 human hepatocarcinoma cell lines. *Toxicol Lett* 165:174-181.
96. Safe S, Wormke M (2003) Inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor alpha cross-talk and mechanisms of action. *Chem Res Toxicol* 16:807-16.
97. Swedenborg E, Pongratz I (2010) AhR and ARNT modulate ER signaling. *Toxicology* 268:132-138.
98. Marques M, Laflamme L, Gaudreau L (2013) Estrogen receptor alpha can selectively repress dioxin receptor-mediated gene expression by targeting DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 41:8094-8102.
99. Mutka SC, Green LH, Verderber EL, Richards JP, Looker DL, et al. (2012) ADH IB expression, but not ADH III, is decreased in human lung cancer. *PLoS One* 7:e52995.
100. Wei RR, Zhang MY, Rao HL, Pu HY, Zhang HZ, et al. (2012) Identification of ADH4 as a novel and potential prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *Med Oncol* 29:2737-2743.
101. Lee SP, Chiang CP, Lee SL, Hsia YJ, Chuang TL, et al. (2006) Immunochemical features in the classification of human alcohol dehydrogenase family. *Alcohol* 39:13-20.
102. Nilsson CB, Hakansson H (2002) The retinoid signaling system-a target in dioxin toxicity. *Crit Rev Toxicol* 32:211-232.
103. Novak J, Benisek M, Hilscherova K (2008) Disruption of retinoid transport, metabolism and signaling by environmental pollutants. *Environ Int* 34:898-913.

104. Ishii Y, Kato H, Hatsumura M, Ishida T, Ariyoshi N, et al. (2001) Effects of a highly toxic coplanar polychlorinated biphenyl, 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl on intermediary metabolism: reduced triose phosphate content in rat liver cytosol. *Fukuoka Igaku Zasshi* 92:190-200.
105. Frueh FW, Hayashibara KC, Brown PO, Whitlock JP Jr (2001) Use of cDNA microarrays to analyze dioxin-induced changes in human liver gene expression. *Toxicol Lett* 122:189-203.
106. Fletcher N, Hanberg A, Hakansson H (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* 62:166-75.
107. Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B (2009) Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev* 89:147-91.
108. Silverstone AE, Rosenbaum PF, Weinstock RS, Bartell SM, Foushee HR, et al. (2012) Polychlorinated biphenyl (PCB) exposure and diabetes: results from the Anniston Community Health Survey. *Environ Health Perspect* 120:727-732.
109. Dong H, Ge X, Shen Y, Chen L, Kong Y, et al. (2009) Gene expression profile analysis of human hepatocellular carcinoma using SAGE and LongSAGE. *BMC Med Genomics* 2:5.
110. Kodama S, Moore R, Yamamoto Y, Negishi M (2007) Human nuclear pregnane X receptor cross-talk with CREB to repress cAMP activation of the glucose-6-phosphatase gene. *Biochem J* 407:373-381.
111. Diani-Moore S, Ram P, Li X, Mondal P, Youn DY, et al. (2010) Identification of the aryl hydrocarbon receptor target gene TiPARP as a mediator of suppression of hepatic gluconeogenesis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and of nicotinamide as a corrective agent for this effect. *J Biol Chem* 285:38801-38810.
112. Clapp RW, Jacobs MM, Loechler EL (2008) Environmental and occupational causes of cancer: new evidence 2005-2007. *Rev Environ Health* 23:1-37.
113. Consonni D, Pesatori AC, Zocchetti C, Sindaco R, D'Oro LC, et al. (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.
114. Inadera H. (2013) Developmental origins of obesity and type 2 diabetes molecular aspects and role of chemicals. *Environ Health Prev Med* 18:185-197.
115. Mann, PC (1997) Selected lesions of dioxin in laboratory rodents. *Toxicol Pathol* 25: 72-79.
116. El-Sabeawy F, Enan E, Lasley B (2001) Biochemical and toxic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in immature male and female chickens. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 129:317-327.
117. Zodrow JM, Stegeman JJ, Tanguay RL (2004) Histological analysis of acute toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in zebrafish. *Aquat Toxicol* 66:25-38.
118. Wahlang B, Beier JJ, Clair HB, Bellis-Jones HJ, Falkner KC, et al. (2013) Toxicant-associated steatohepatitis. *Toxicol Pathol* 41:343-360.
119. Taylor KW, Novak RF, Anderson HA, Birnbaum LS, Blystone C, et al. (2013) Evaluation of the association between persistent organic pollutants (POPs) and diabetes in epidemiological studies: a national toxicology program workshop review. *Environ Health Perspect* 121:774-783.
120. De Tata, V (2014) Association of dioxin and other persistent organic pollutants (POPs) with diabetes: epidemiological evidence and new mechanisms of beta cell dysfunction. *Int J Mol Sci* 15: 7787-7811.

Figure legends

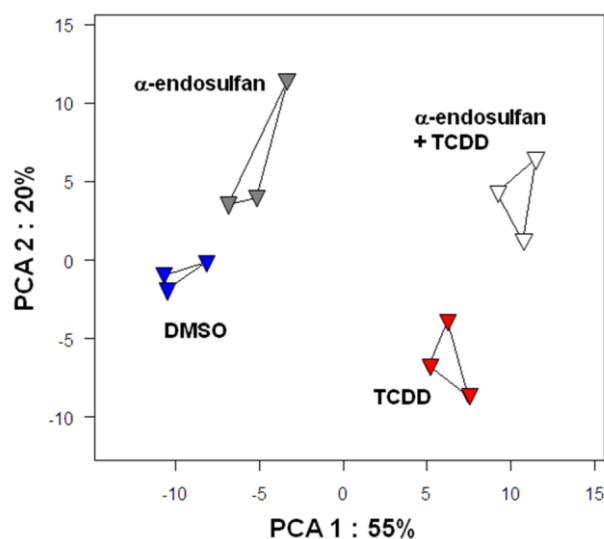


Figure 1. Principal Component Analysis (PCA) of the top 1,000 most variable genes.

The expression profiles discriminate the experimental conditions. The total variance explained by either component is given in %. Triangles represent the samples and the lines connect the samples from the same experimental condition: DMSO (blue), α -endosulfan (grey), TCDD (red), mixture of TCDD and α -endosulfan (white).

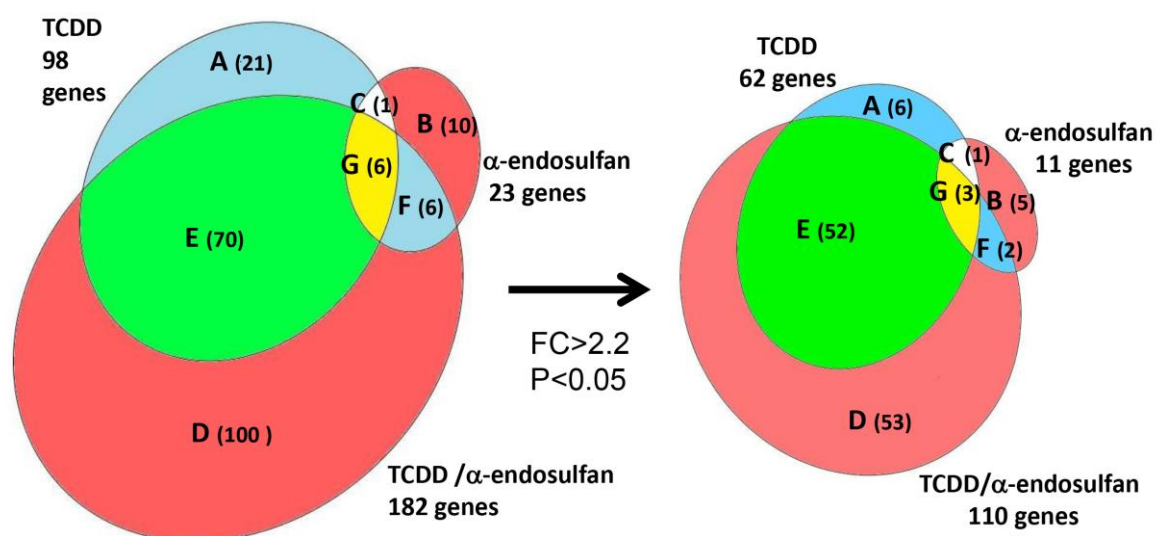


Figure 2. Exact-area proportional Euler diagram for the genes that are differentially regulated by the POP treatments. The total numbers of genes up- and down-regulated (left, $p\text{-value} \leq 0.05$, >2 -fold change, absolute value, right, $p\text{-value} \leq 0.05$, >2.2 -fold change, absolute value) following exposure of differentiated HepaRG cells to 25nM TCDD, 10 μ M α -endosulfan or their combination for 30H are shown.

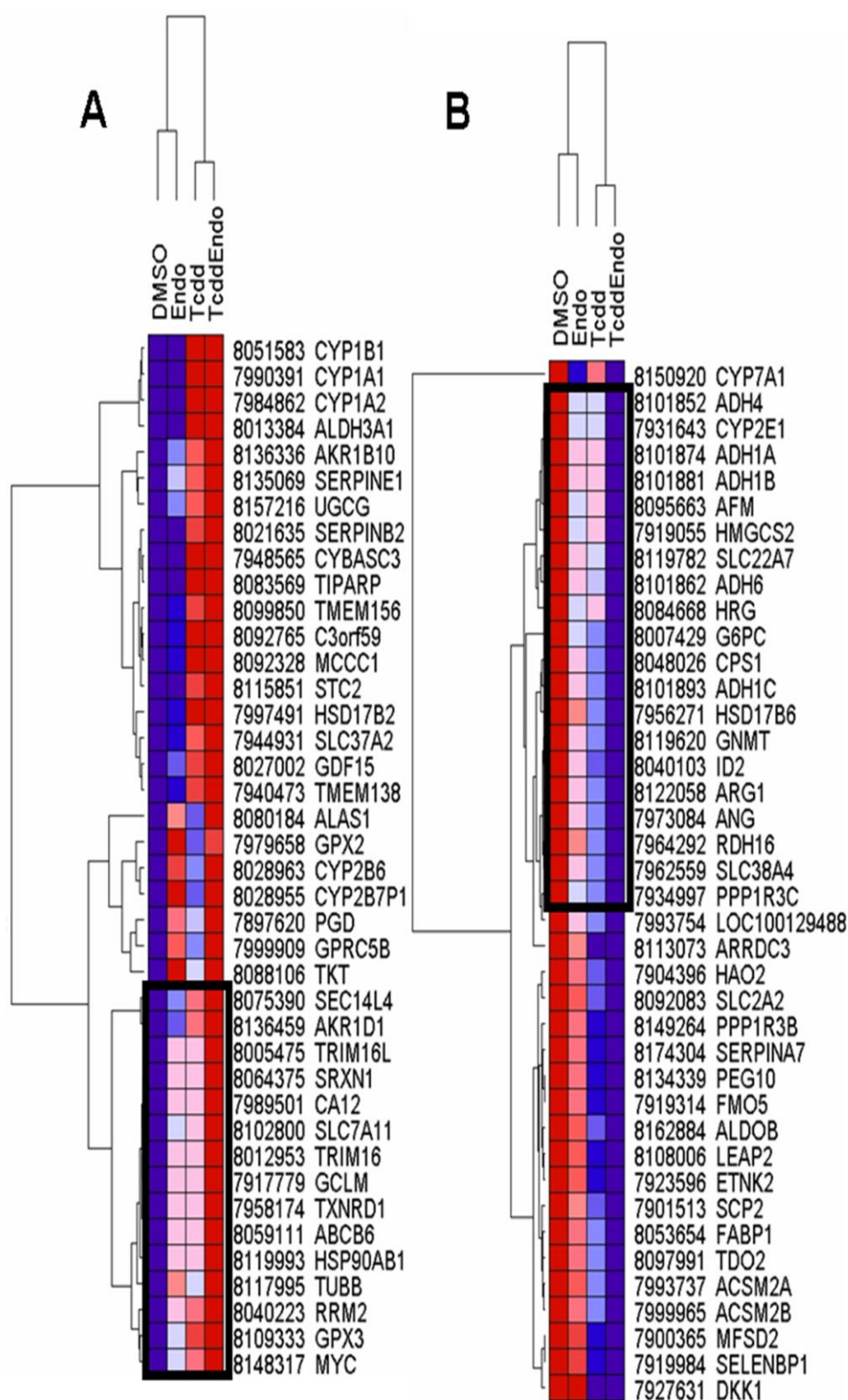


Figure 3. Hierarchical clustering analysis of 80 genes showing the greatest changes compared to vehicle (0.15% DMSO). Increased (N=40) and decreased (N=40) levels of expression are shown in the left (A) and right (B) panels, respectively. The rows represent the

genes. The columns represent the enrichment scores for each gene in the treatments. The black lined boxes indicate gene clusters that show strongly increased up-regulation (A) or down-regulation (B) after treatment of cells with the mixture compared to the individual POPs. Red and blue colors indicate up- and down-regulation, respectively.

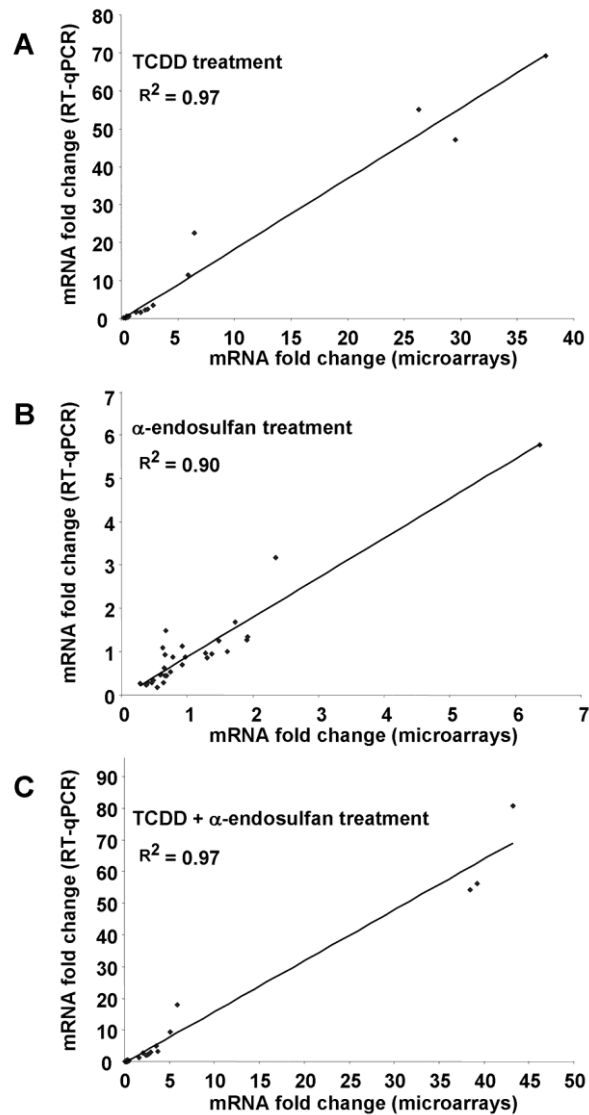
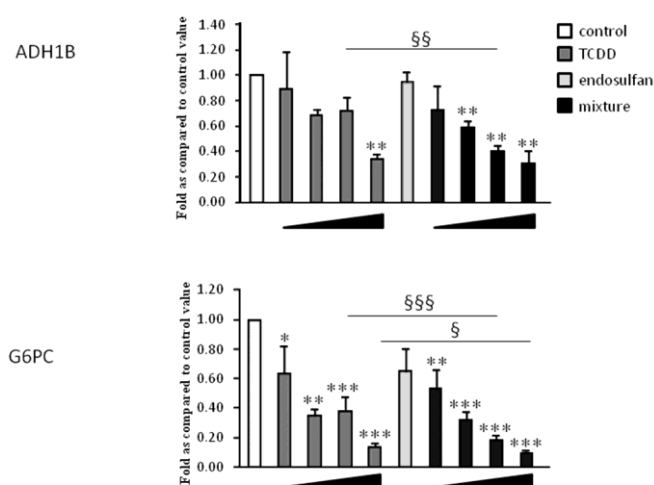


Figure 4. Comparison between the levels of expression of genes as measured by microarrays and RT-qPCR. A. Comparison for the treatment with TCDD (25nM, 30H). **B.** Comparison for the treatment with α -endosulfan (10 μ M, 30H). **C.** Comparison for the combined treatment with TCDD (25nM, 30H) and α -endosulfan (10 μ M, 30H). The correlation coefficients R^2 are 0.97, 0.90, and 0.97 for the treatments with TCDD, α -endosulfan and the mixture, respectively.

A



B

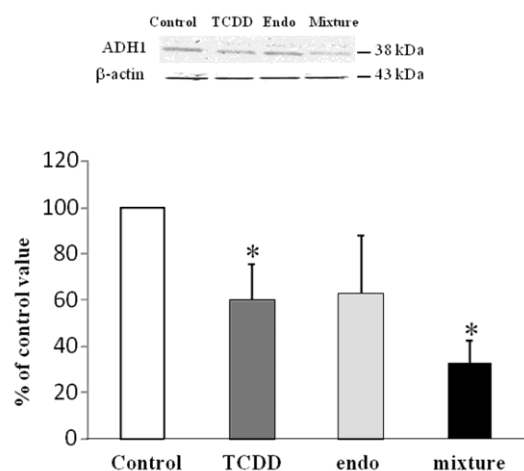
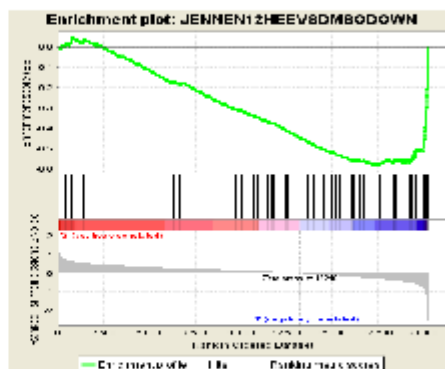
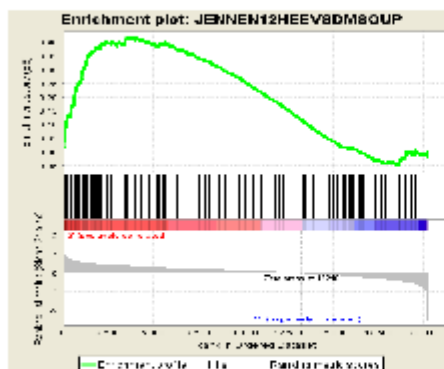
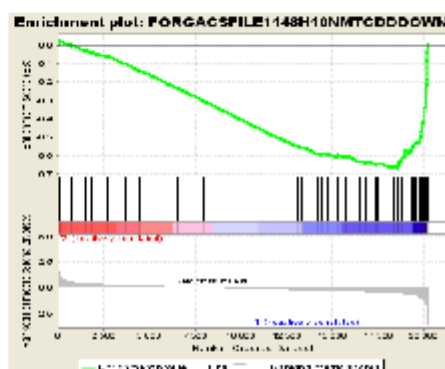
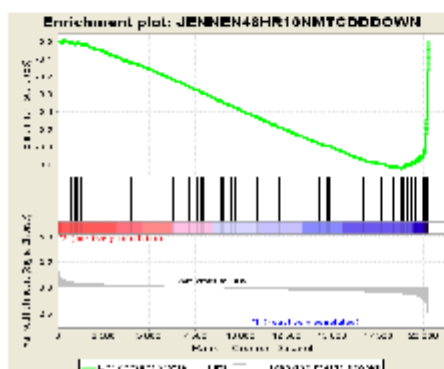
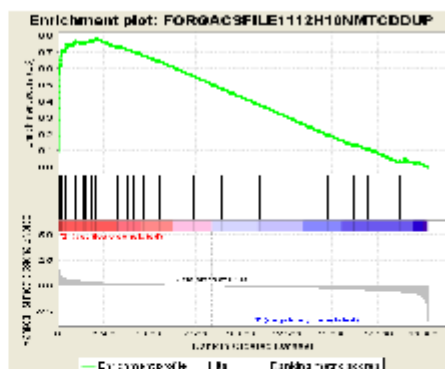
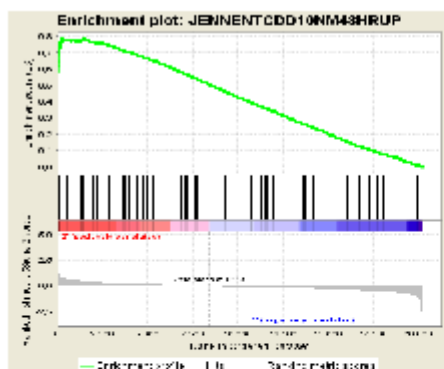


Figure 5. mRNA and protein levels of ADH1B and G6PC after pollutant exposure. A.

HepaRG cells were exposed for 8 days to a range (0.2; 0.5; 1; 5 nM) of TCDD concentrations, to 1μM α-endosulfan and to the combination of 1μM α-endosulfan with the various concentrations of TCDD. The levels of mRNA, as measured by RT-qPCR, are expressed as the fold-change as compared to the control value. * represent the level of significance of the fold-change as compared to the control (*, $p<0.05$, **, $p<0.01$, ***, $p<0.001$) and \$ represent the the level of significance of the fold-change of the mixture as compared to TCDD treatment alone (\$, $p<0.05$, §§, $p<0.01$, §§§, $p<0.001$). The values are the results of 5 independent experiments in triplicate. **B.** HepaRG cells were exposed for 72H to TCDD (25nM), α-endosulfan (10μM) or the mixture. A typical Western blot analysis of the ADH1 protein is shown above and, below, the quantification of 3 independent experiments.

*, $p<0.05$.

A



B

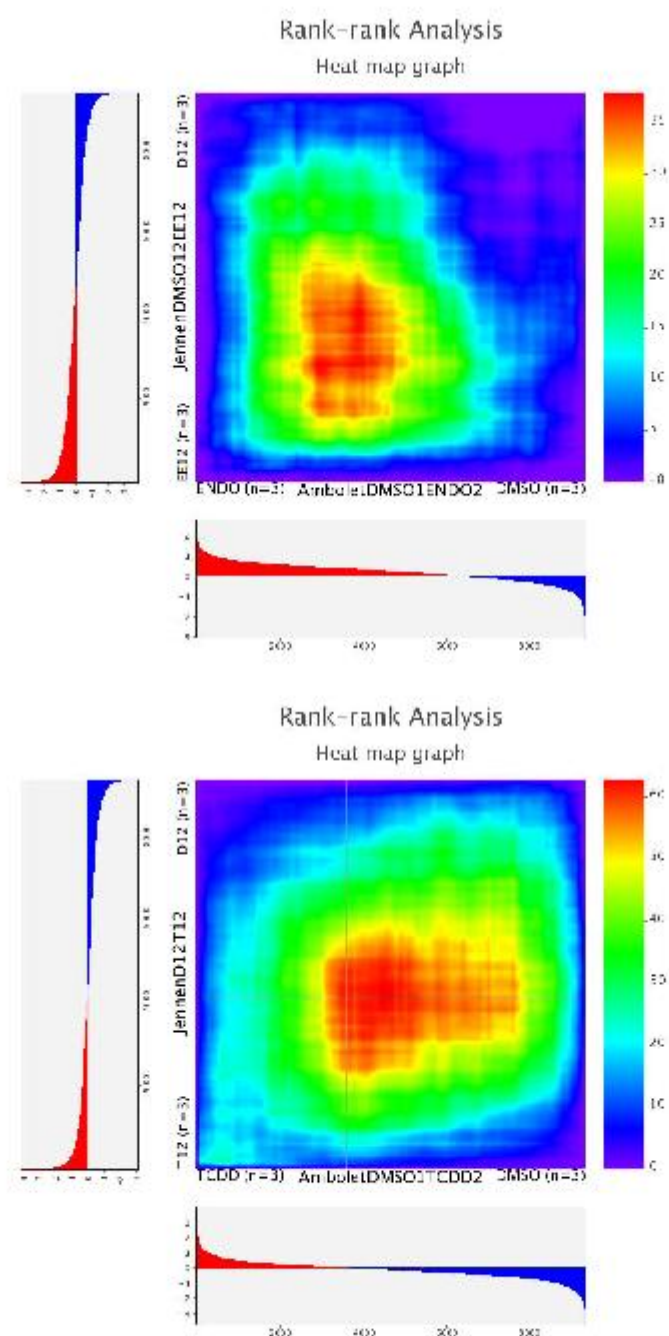


Figure 6. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) and Rank Rank Hypergeometric Overlap Analysis. A. GSEA plots for the gene sets up-regulated by TCDD (first row) derived from the data of Jennen et al. [42] (left, 10nM TCDD, 48H treatment) and Forgacs et al. [58] (right, 10 nM TCDD, 12H treatment), for gene sets down-regulated by TCDD (second row) from the data of Jennen et al. [42] (left, 10 nM TCDD, 48H treatment) and

Forgacs et al. [58] (right, 10 nM TCDD, 48H treatment), for gene sets up- and down-regulated by 17 β -estradiol (third row) from the data of Jennen et al. [42] (left, up-regulated, right, down-regulated, 30 mM 17 β -estradiol, 12H treatment). The abscissas correspond to the ordered list of genes that are differentially expressed for HepaRG cells treated or not by TCDD in this study. The ordinates represent the cumulative distribution (enrichment score, green line) for the cells (HepaRG or primary human hepatocytes) treated or not with TCDD. The red and blue colors indicate enrichment and depletion, respectively, of genes. **B.** Rank rank hypergeometric overlap heat plots of expression data from this paper (abscissas) and that from Jennen et al. [42] (ordinates) for treatment with 10 μ M α -endosulfan, 30H and 30 μ M 17 β -estradiol, 12H, respectively (top) and for treatment with 25 nM TCDD, 30H and 10 nM TCDD, 12H, respectively (bottom). The metric on the right represents the log₁₀-transformed t-test P-value. Pixels with positive values (red) indicate a higher than expected number of overlapping genes and pixels with negative values (blue) indicate a lower than expected number of overlapping genes. Overlap is seen here by the orange areas.

Supporting Information Legends

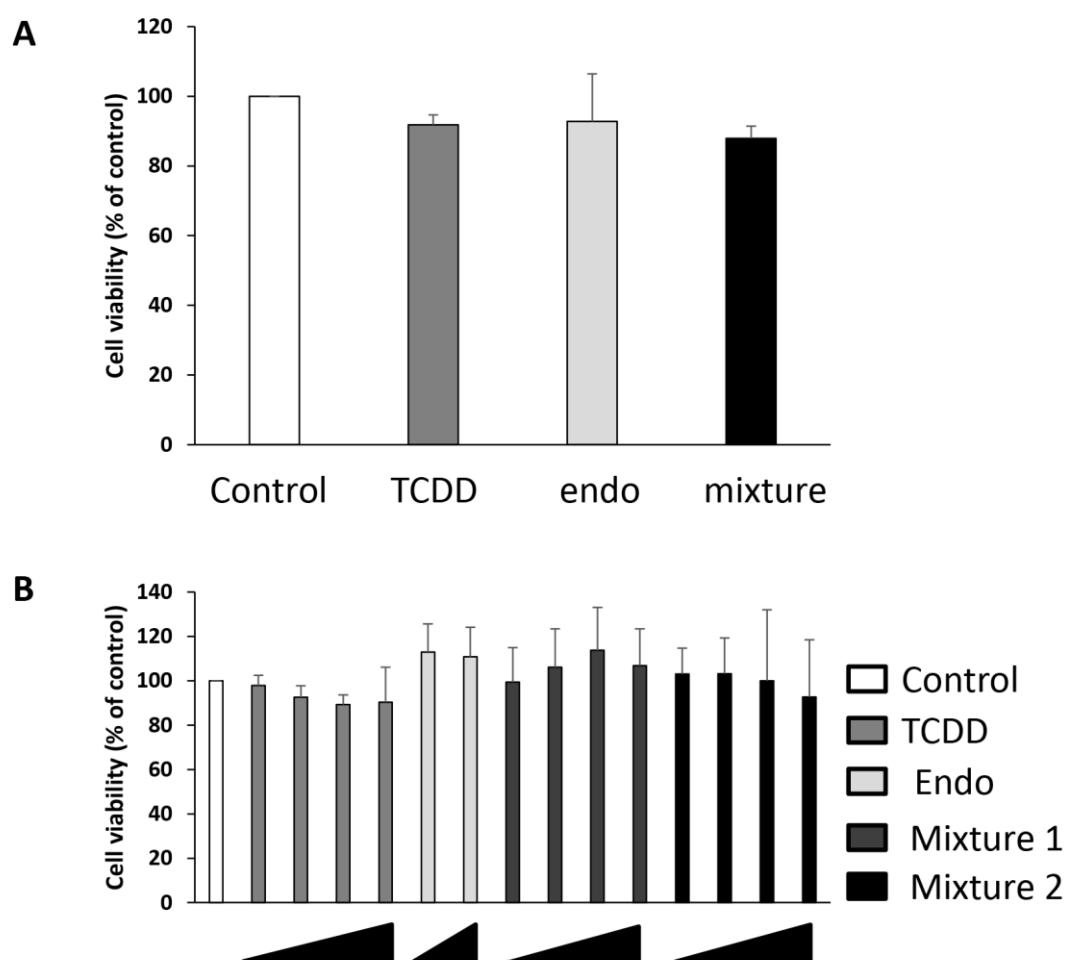


Figure S1. Cell viability after 3 or 8 days of exposure to pollutants. **A.** HepaRG cells (6×10^4 cells/well in a 96 well plate) were exposed for 72H to the control medium or TCDD (25nM), or α -endosulfan (10 μ M) or the mixture. **B.** HepaRG cells were exposed for 8 days to a range (0.2; 0.5; 1; 5 nM) of TCDD concentrations, to 3 or 10 μ M α -endosulfan and to the combinations of 3 μ M (mixture 1) or 10 μ M (mixture 2) α -endosulfan with the various concentrations of TCDD (from left to right). Viability was measured in 3 (A) or 4 (B) independent experiments in triplicate using the WST-1 kit (Roche Applied Science) according to the manufacturer's instructions. Viability is expressed as % of the control

condition (100%). No statistical difference in the viability of the cells after the various treatments was found.

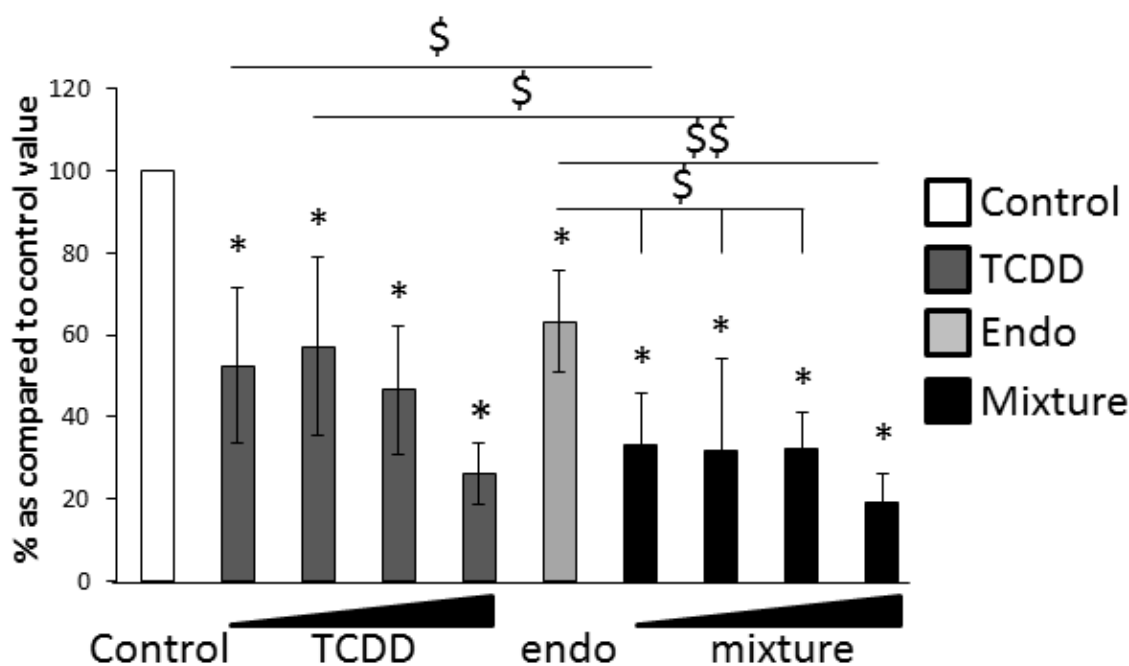


Figure S2. mRNA level of G6PC after 8 days of pollutant exposure. HepaRG cells were exposed for 8 days to a range (0.2, 0.5, 1 and 5 nM) of TCDD concentrations, to 3μM α-endosulfan and to the combination of 3μM α-endosulfan with the various concentrations of TCDD. The levels of mRNA, as measured by RT-qPCR, are expressed as the % as compared to the control value (=100%). * represents the level of significance of the fold-change as compared to the control (*, $p < 0.001$) and \$ represent the level of significance of the fold-change of the mixture as compared to either TCDD or α-endosulfan treatment alone (\$, $p < 0.05$, \$\$, $p < 0.001$). The values are the results of 3 independent experiments in duplicate.

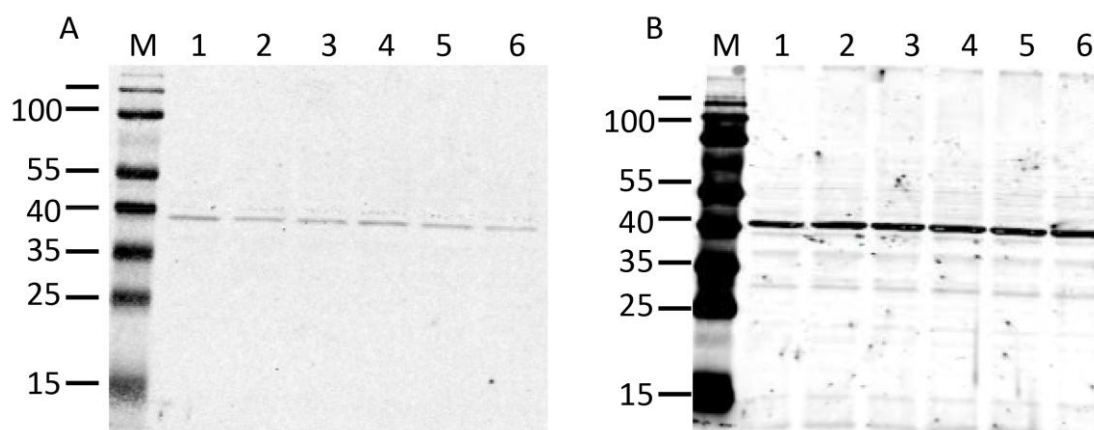


Figure S3. Western blot of ADH1 after pollutant exposure. A. HepaRG cells were exposed for 72H to either no treatment or to TCDD (5 and 25nM), α -endosulfan (10 μ M) or the mixtures. Typical Western blots of the ADH1 (A, 38kDa) and β -actin (B, 43kDa) proteins are shown. M corresponds to the markers (molecular weights indicated to the left of the blots). Lanes 1, 2, 3, 4, 5 and 6 correspond, respectively, to no treatment, treatment with 5nM TCDD, 25nM TCDD, 10 μ M α -endosulfan, 5nMTCDD + 10 μ M α -endosulfan and 25nMTCDD + 10 μ M α -endosulfan.

Tables

Table 1
Primer sequences for RT-qPCR assays

Gene	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
ADH1A	GGCATCAGCACCTTCTCAC	GACCTTGGCAACATTGACTG
ADH1B	GGCAGAGAAGACAGAAACGAC	CAACCTCCACATCCTCAATG
ADH1C	CTGCTTCGCTCTGGAAG	GAGGAGGCTGAAAACGTC
ADH4	GCATTGAAGAGGTTGAAGTAGC	GATAACAGTGGCATCAGTATGG
ADH6	GGAAGTTCGCATAAAGGTTG	CAAGATGGTGGGATACAAGAG
CYP2E1	ACTATGGGATGGGGAAACAG	GAGGATGTCGGCTATGACG
SERPINB2	GCTGTTTGGTGAGAAGTCTG	GCCTTTGGTTTGAGTCTTG
STC2	GGAAGAGGGGAGCACAAAG	CAGCGTTGACCAAACAGTG
SLC7A11	TGGCAGTGACCTTTTCTGAG	CCTGGAGACAGCAAACACAC
DTL	GTCCAGTTCTCTCTTTTG	CCAGTGAGCCATCCATTG
SLC9A9	GCTGCTCCTCGTGTTCTTC	TGCTTCCTGGTGTTGTGAG
ABCG8	GCCTCCTTCTTCAGCAATG	TCAGCCCTTCAAAACACC
ALDH3A1	CAGAAGGTGGCTTATGGG	ACGCTGGTTGATGAACTG
AFM	ATGAAGTTGCCAGAAGGAAC	ATTGTGTGACAGGTATTGCC
AQP9	GCAGCTTAGCGAAAGAAACC	TGCAACTGCCATTGAAAATC
GPX2	TTTGGACATCAGGAGAACTG	TTCAGGTAGGCGAAGACAG
MBL2	ATGGTGGCAGCGTCTTAC	CCTGGTTCCCCCTTTTC
SLC22A7	CGTTGGGGGAAGAAAGG	CGGCGAAGAAGAAAGTGG
SLC38A4	GCAGTCCTTGTGGCAGTAAC	CCCCTATGAATCCGAAGATG
G6PC	TTGTGGTTGGGATTCTGG	CTGTGGATGTGGCTGAAAG
SDS	ATGAAGGTGCCACAGTCAAG	TCAAAGGGGGGAATGTAGAC
HMGCS2	CCCGTCTAAAGGTGTTCTG	AGCCCAGGACAGTGATTG
CYP1A1	GGTCAAGGAGCACTACAAAACC	TGGACATTGGCGTTCTCAT
CYP1A2	ACAGCACAACAAGGGACACA	TGCCAAACAGCATCATCTTC
CYP3A4	GATGGCTCTCATCCAGACTT	AGTCCATGTGAATGGGTTC
CYP2B6	TTCAGGAGGAGGCTCAGTGT	GGCCGAATACAGAGCTGATG
RPL13A	AAGGTCGTGCGTCTGAAG	GAGTCCGTGGGTCTTGAG
GDF15	GCTACGAGGACCTGCTAAC	ACTTCTGGCGTGAGTATCC
NEIL3	TTCCAGCCAGAATGTCTTGAG	CCGAAATGAATCCGTAAAGC
HAO2	CCTGAACTGTGGGTAGTGATG	GCCTGAAAGTCTGTCAAACAC
SLC2A2	CACCTGGCACTTTTCATCAG	AGGTATCTGGGGCTTTCTG
CA12	TCTTGGCATCTGTATTGTGG	GGCTGGCTTGTAATGACTC
CYP7A1	CCATTCCAGCGACTTTCTG	AGCCTCAGCGATTCTCTG
PON1	CATAAAAGTGCTCAGGTCCACAG	TGGAATTGGGGATCACTGGAAG
SULT2A1	CCTGAACTGTGGGTAGTGATG	GCCTGAAAGTCTGTCAAACAC

Table 2
Genes exhibiting at least a 2-fold change in expression in HepaRG cells exposed for 30 hours
to either 25nM TCDD only or 10µM α-endosulfan only or the combination of TCDD plus α-endosulfan only

Gene symbol	Gene name	mRNA fold change by		
		TCDD	α-endosulfan	combination
Genes regulated by TCDD only				
KRTAP21-1	keratin associated protein 21-1	3.65	3.97*	3.51*
<u>TRPV6</u>	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 6	2.40	0.92	1.15
<u>S100A8</u>	S100 calcium binding protein A8	2.26	0.83	1.84
<u>HK2</u>	hexokinase 2	2.24	0.92	2.23*
<u>UBE2U</u>	ubiquitin-conjugating enzyme E2U (putative)	2.23	1.16	
SCN1A	sodium channel, voltage-gated, type I, alpha subunit	2.11	1.17	1.62
SLC22A3	solute carrier family 22 (extraneuronal monoamine transporter), member 3	0.50	0.99	0.55
RASGEF1B	RasGEF domain family, member 1B	0.50	1.00	0.59
CLEC4E	C-type lectin domain family 4, member E	0.50	0.50*	0.37*
ABI3BP	ABI family, member 3 (NESH) binding protein	0.50	1.00	0.59
SLC16A12	solute carrier family 16, member 12 (monocarboxylic acid transporter 12)	0.49	1.44	0.65
MRC1	mannose receptor, C type 1	0.49	0.73	0.42*
ABCD2	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 2	0.49	0.98	0.54
MCF2	MCF.2 cell line derived transforming sequence	0.49	0.94	0.54
CIDEc	cell death-inducing DFFA-like effector c	0.48	1.10	0.63
OR10R2	olfactory receptor, family 10, subfamily R, member 2	0.48	0.83	0.39*
KCNB1	potassium voltage-gated channel, Shab-related subfamily, member 1	0.48	1.41	0.82
GHR	growth hormone receptor	0.48	1.03	0.56
OR7E18P	olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 18 pseudogene	0.48	1.00	0.90
GYS2	glycogen synthase 2 (liver)	0.46	1.34	0.56

<u>GZMK</u>	granzyme K (granzyme 3; tryptase II)	0.43	0.63	0.81
Genes regulated by α-endosulfan only				
<u>OR2T4</u>	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 4	1.59	2.44	2.03*
<u>SFRP4</u>	secreted frizzled-related protein 4	0.79	2.19	1.65
NCRNA00052	non-protein coding RNA 52	0.63	0.50	0.68
CPA3	carboxypeptidase A3 (mast cell)	1.04	0.50	0.90
LIP1	lipase, member I	1.22	0.49	0.85
FAM99A	family with sequence similarity 99, member A	3.01*	0.27	0.62
CNGA1	cyclic nucleotide gated channel alpha 1	0.57	0.47	0.50*
<u>FAM71D</u>	family with sequence similarity 71, member D	1.08	0.44	0.69
<u>LOC651503</u>	seven transmembrane helix receptor	1.42	0.34	0.94
<u>LOC441233</u>	hypothetical gene supported by AK128010	0.76	0.25	0.43*
Genes regulated by the combination TCDD plus α-endosulfan only				
LOC100130904	similar to CD177 molecule	2.64*	2.39*	3.64
VDR	vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor	2.58*	1.26	3.38
LOC732275	similar to hCG1645603	0.98	1.31	3.04
DTL	denticleless homolog (Drosophila)	1.42	1.76	2.99
FAM111B	family with sequence similarity 111, member B	1.58	1.87	2.83
SLC9A9	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 9	2.11*	1.29	2.75
GPRC5B	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B	1.42	2.18*	2.72
E2F7	E2F transcription factor 7	1.65	1.61	2.71
EXO1	exonuclease 1	1.56	2.06*	2.68
DCLK1	doublecortin-like kinase 1	1.61	1.87	2.62
NEIL3	nei endonuclease VIII-like 3 (E. coli)	1.69	1.92	2.62
XRCC2	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2	1.51	1.66	2.57
RIBC2	RIB43A domain with coiled-coils 2	1.62	1.84	2.55

PTPRE	protein tyrosine phosphatase, receptor type, E	2.02*	1.35	2.47
SEC14L4	SEC14-like 4 (<i>S. cerevisiae</i>)	2.18*	1.41	2.46
RAD51	RAD51 homolog (RecA homolog, <i>E. coli</i>) (<i>S. cerevisiae</i>)	1.41	1.86	2.45
CA12	carbonic anhydrase XII	1.73	1.61	2.45
PFKP	phosphofructokinase, platelet	1.87	1.30	2.35
FBXW10	F-box and WD repeat domain containing 10	1.51	1.59	2.31
C22orf9	chromosome 22 open reading frame 9	1.93	1.18	2.29
ORC1L	origin recognition complex, subunit 1-like (yeast)	1.42	1.49	2.27
HIST1H3A	histone cluster 1, H3a	1.28	1.64	2.26
G6PC2	glucose-6-phosphatase, catalytic, 2	2.13*	2.06*	2.22
HIST1H3B	histone cluster 1, H3b	1.31	1.64	2.21
CDRT1	CMT1A duplicated region transcript 1	1.46	1.68	2.19
CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20	1.57	1.35	2.14
SSH1	slingshot homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	1.55	1.22	2.13
ARMC9	armadillo repeat containing 9	1.81	1.05	2.12
ALPP	alkaline phosphatase, placental (Regan isozyme)	1.44	1.40	2.12
ARSI	arylsulfatase family, member I	2.42*	0.92	2.12
MCM5	minichromosome maintenance complex component 5	1.39	1.56	2.11
FAM46C	family with sequence similarity 46, member C	1.86	1.21	2.11
ADAM12	ADAM metalloproteinase domain 12	1.72	1.54	2.08
CDC6	cell division cycle 6 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	1.27	1.50	2.07
MLLT1	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, <i>Drosophila</i>); translocated to, 1	1.87	1.20	2.06
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	1.74	1.40	2.06
NCF2	neutrophil cytosolic factor 2	1.32	1.41	2.06
CDCA7	cell division cycle associated 7	1.55	1.57	2.05
WDR76	WD repeat domain 76	1.22	1.54	2.05
MCM2	minichromosome maintenance complex component 2	1.45	1.35	2.05

SRXN1	sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae)	1.55	1.48	2.03
CCNE2	cyclin E2	1.20	1.36	2.03
CFHR3	complement factor H-related 3	0.64	0.74	0.50
CYP2A6	cytochrome P450, family 2, subfamily A, polypeptide 6	0.54	0.92	0.50
AHSG	alpha-2-HS-glycoprotein	0.62	0.66	0.50
CYP2A13	cytochrome P450, family 2, subfamily A, polypeptide 13	0.55	0.91	0.50
DGAT2	diacylglycerol O-acyltransferase homolog 2 (mouse)	0.57	0.80	0.50
PDE8B	phosphodiesterase 8B	0.51	1.00	0.50
ABCC9	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9	0.55	0.92	0.49
C12orf27	chromosome 12 open reading frame 27	0.61	0.88	0.49
HFE2	hemochromatosis type 2 (juvenile)	0.56	0.65	0.49
CIDEB	cell death-inducing DFFA-like effector b	0.61	0.82	0.49
SLCO1B1	solute carrier organic anion transporter family, member 1B1	0.62	0.81	0.49
AQP9	aquaporin 9	0.53	0.97	0.49
C7orf45	chromosome 7 open reading frame 45	0.78	0.74	0.49
RORC	RAR-related orphan receptor C	0.61	0.72	0.48
SLC38A3	solute carrier family 38, member 3	0.64	0.77	0.48
ALDOB	aldolase B, fructose-bisphosphate	0.59	0.80	0.48
CCIN	calicin	0.87	0.68	0.48
LST-3TM12	organic anion transporter LST-3b	0.64	0.80	0.48
CYP2A7	cytochrome P450, family 2, subfamily A, polypeptide 7	0.51	0.91	0.48
SELENBP1	selenium binding protein 1	0.53	0.91	0.48
CALML4	calmodulin-like 4	0.56	0.82	0.47
ANG	angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5	0.60	0.74	0.47
CDC20B	cell division cycle 20 homolog B (S. cerevisiae)	0.67	0.64	0.47
PLA2G12B	phospholipase A2, group XIIB	0.60	0.75	0.46
DAB1	disabled homolog 1 (Drosophila)	0.52	0.90	0.46
CFHR2	complement factor H-related 2	0.57	0.90	0.46
SCGN	secretagogin, EF-hand calcium binding protein	0.51	0.92	0.46

GLYAT	glycine-N-acyltransferase	0.52	0.94	0.46
LOC441178	hypothetical LOC441178	0.67	0.52	0.46
OTC	ornithine carbamoyltransferase	0.57	0.70	0.45
PKLR	pyruvate kinase, liver and RBC	0.74	0.71	0.45
PON1	paraoxonase 1	0.6	0.75	0.45
GLYATL1	glycine-N-acyltransferase-like 1	0.51	0.75	0.45
SLC10A5	solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 5	0.59	0.75	0.44
SLC22A10	solute carrier family 22, member 10	0.66	0.53	0.44
AGXT2	alanine-glyoxylate aminotransferase 2	0.55	0.84	0.43
HRG	histidine-rich glycoprotein	0.64	0.61	0.43
ANGPTL5	angiotensin-like 5	0.96	1.11	0.41
ARG1	arginase, liver	0.56	0.72	0.41
HSD17B6	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 6 homolog (mouse)	0.57	0.74	0.41
PCK2	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)	0.51	0.73	0.41
SULT1E1	sulfotransferase family 1E, estrogen-preferring, member 1	0.48*	0.72	0.41
SLC17A4	solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 4	0.53	0.83	0.40
SLC5A9	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 9	0.53	0.83	0.40
LRRC31	leucine rich repeat containing 31	0.54	0.68	0.40
BDH1	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 1	0.59	0.69	0.39
HSD3B1	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1	0.62	0.71	0.39
ADH1C	alcohol dehydrogenase 1C (class I), gamma polypeptide	0.57	0.71	0.38
RANBP3L	RAN binding protein 3-like	0.51	0.79	0.38
PGLYRP2	peptidoglycan recognition protein 2	0.62	0.60	0.37
BBOX1	butyrobetaine (gamma), 2-oxoglutarate dioxygenase (gamma-butyrobetaine hydroxylase) 1	0.40*	0.81	0.36
ANXA13	annexin A13	0.50*	0.72	0.35
ADH6	alcohol dehydrogenase 6 (class V)	0.56	0.65	0.35
ADH1B	alcohol dehydrogenase 1B (class I), beta polypeptide	0.65	0.67	0.33
PSMAL	growth-inhibiting protein 26	0.54	0.58	0.33

FOLH1	folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1	0.55	0.58	0.32
UGT2B17	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B17	0.69	0.57	0.31
ADH1A	alcohol dehydrogenase 1A (class I), alpha polypeptide	0.61	0.56	0.28

The mRNA fold change for each gene corresponds to the ratio of mRNA expression for cells exposed to each treatment (25nM TCDD or 10μM α-endosulfan or the combination) versus that for untreated cells (0.15% DMSO). The values (fold change >2 for up-regulated genes or < 0.5 for down-regulated genes) are the means of three microarray experiments. All the genes are significantly differentially expressed with p < 0.05 by Fisher t-test analysis for the treatment designated for each sub-group. For the other treatments, the fold change was either below two-fold change or not statistically significant (labeled with an asterisk *, if p-value >0.05). The genes underlined in the first two sections of the table are those retained after filtering with increased stringency (fold change>2.2 or <0.46, p-value<0.05), see text for discussion.

Table 3
Genes regulated in cells following exposure to either TCDD or α -endosulfan alone and to their combination

Gene symbol	Gene name	mRNA fold-change by	
Genes regulated by either TCDD or the combination TCDD plus α -endosulfan		TCDD	combination
CYP1A2	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2	51.40	34.27
CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	49.38	48.21
CYP1A1	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	37.55	38.48
STC2	stanniocalcin 2	29.30	43.39
SERPINB2	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	26.07	38.3
TMEM156	transmembrane protein 156	13.37	16.72
SLC37A2	solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 2	8.70	16.36
ALDH3A1	aldehyde dehydrogenase 3 family, memberA1	6.49	5.88
C3orf59	chromosome 3 open reading frame 59	6.42	6.41
MBL2	mannose-binding lectin (protein C) 2, soluble (opsonic defect)	6.07	5.33
IGFBP1	insulin-like growth factor binding protein 1	4.28	3.51
SLC7A5	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5	3.98	4.79
TIPARP	TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase	3.90	4.19
CYBASC3	cytochrome b, ascorbate dependent 3	3.89	4.01
IL17RB	interleukin 17 receptor B	3.70	3.70
IER3 ^a	immediate early response 3	3.25-3.27	4.08-4.12
RAP1GAP	RAP1 GTPase activating protein	2.84	3.26
GDF15	growth differentiation factor 15	2.81	3.55
SYT12	synaptotagmin XII	2.66	3.26
HSD17B2	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2	2.63	2.49
PAPPA	pregnancy-associated plasma protein A, pappalysin 1	2.51	2.64
GRIA3	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 3	2.40	2.56
SLC7A11	solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 11	2.38	3.75
ASAM	adipocyte-specific adhesion molecule	2.36	2.67
VWCE	von Willebrand factor C and EGF domains	2.32	2.39
BMF	Bcl2 modifying factor	2.31	2.38
EREG	epiregulin	2.31	2.40
RUNX2	runx-related transcription factor 2	2.26	2.14
MCCC1	methylcrotonoyl-Coenzyme A carboxylase 1 (alpha)	2.18	2.14

AKR1B10	aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase)	2.18	2.57
PNMA2	paraneoplastic antigen MA2	2.15	2.45
STON2	stonin 2	2.11	2.23
CYP19A1	cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1	2.11	2.48
SLC6A6	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6	2.07	2.46
TMEM138	transmembrane protein 138	2.07	2.32
PLEKHF1	pleckstrin homology domain containing, family F (with FYVE domain) member 1	2.05	2.48
NPTX2	neuronal pentraxin II	2.04	2.66
UGCG	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	2.04	2.38
GPR175	G protein-coupled receptor 175	2.03	2.21
SLCO2B1	solute carrier organic anion transporter family, member 2B1	0.50	0.44
PLGLA	plasminogen-like A	0.49	0.49
MCTP1	multiple C2 domains, transmembrane 1	0.49	0.50
DLEU2L	deleted in lymphocytic leukemia 2-like	0.49	0.44
SLC22A7	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 7	0.48	0.28
CYP4X1	cytochrome P450, family 4, subfamily X, polypeptide 1	0.48	0.36
ABCG8	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 8	0.47	0.33
SLC38A4	solute carrier family 38, member 4	0.45	0.26
ACOT12	acyl-CoA thioesterase 12	0.45	0.43
ADRA1A	adrenergic, alpha-1A-, receptor	0.44	0.39
KDR	kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)	0.44	0.41
ABCG5	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 5	0.44	0.30
FABP1	fatty acid binding protein 1, liver	0.43	0.27
LEAP2	liver expressed antimicrobial peptide 2	0.42	0.30
SERPINA7	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 7	0.42	0.33
FMO5	flavin containing monooxygenase 5	0.41	0.38
LOC100129488	hypothetical protein LOC100129488	0.41	0.27
GPD1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	0.39	0.31
SLC2A2	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2	0.38	0.21
SLC10A1	solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 1	0.38	0.47
PPP1R3B	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3B	0.36	0.33
THRSP	thyroid hormone responsive (SPOT14 homolog, rat)	0.36	0.39
CXCL13	chemokine (C-X-C motif) ligand 13	0.35	0.41
HAO2	hydroxyacid oxidase 2 (long chain)	0.34	0.17
CTGF	connective tissue growth factor	0.34	0.37

DNAJC15	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 15	0.32	0.41
RDH16	retinol dehydrogenase 16 (all-trans)	0.31	0.16
MFSD2	major facilitator superfamily domain containing 2	0.30	0.25
CYP4B1	cytochrome P450, family 4, subfamily B, polypeptide 1	0.28	0.36
PFKFB1	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 1	0.26	0.31
DKK1	dickkopf homolog 1 (<i>Xenopus laevis</i>)	0.18	0.20
		mRNA fold-change by	
Genes regulated by either α-endosulfan or the combination TCDD plus α-endosulfan		α-endosulfan	combination
GPX2	glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)	2.36	2.04
CYP2B6	cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6	2.14	2.35
LOC221442	hypothetical LOC221442	2.08	2.11
CYP2E1	cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1	0.49	0.19
LOC441120	hypothetical LOC441120	0.35	0.41
CYP7A1	cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1	0.28	0.21

The mRNA fold change for each gene corresponds to the ratio of mRNA expression for cells exposed to each treatment (25nM TCDD or 10 μ M α -endosulfan or their combination) versus that for untreated cells (0.15% DMSO). The values (fold change >2 for up-regulated genes or < 0.5 for down-regulated genes) are the means of three microarray experiments. All the genes are significantly differentially expressed with $p < 0.05$ by Fisher t-test analysis. ^a Values correspond to several probes in the microarray.

Table 4
Genes differentially down-regulated in HepaRG cells following exposure to either 25nM TCDD or 10µM α-endosulfan or their combination for 30 hours)

Gene symbol	Gene name	mRNA fold change		
		TCDD	α-endosulfan	combination
G6PC	glucose-6-phosphatase, catalytic subunit	0.23	0.38	0.09
ADH4	alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide	0.38	0.40	0.13
HMGCS2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 (mitochondrial)	0.50	0.46	0.19
GNMT	glycine N-methyltransferase	0.33	0.43	0.20
CPS1	carbamoyl-phosphate synthetase 1, mitochondrial	0.35	0.47	0.22
AFM	afamin	0.50	0.48	0.27

All these genes exhibit at least a 2-fold change in expression for cells exposed to all 3 treatments as compared to the control condition. The values are the means of three microarray experiments ($p \leq 0.05$). Down-regulated genes show a fold change <1 as compared to the control condition.

Table 5

Focus analysis top regulated genes differentially expressed following exposure of cells to the combination of TCDD + α -endosulfan as compared to all other treatments

Gene symbol	Gene name / function	mRNA fold change by TCDD + α -endosulfan
Up-regulated genes		
STC2*	stanniocalcin 2 / oxidative stress	43.40
SERPINB2*	serpine peptidase inhibitor, member 2 / cell migration	38.30
SLC37A2*	solute carrier family 37, member 2 / stress response	19.75
SLC7A11*	solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y ⁺ system) member 11 / oxidative stress	3.75
GDF15*	growth differentiation factor 15 / stress response	3.55
AKR1B10*	aldo-keto reductase family 1, member B10/ fatty acid biosynthesis	2.57
CA12	carbonic anhydrase XII / hypoxic stress	2.45
serpine 1	serpine peptidase inhibitor / cell migration	1.89
MT1A	metallothionein 1A / oxidative stress	1.83
ST3GAL5	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 5 / cell differentiation & proliferation	1.78
Down-regulated genes		
G6PC ^{\$}	glucose 6 phosphatase, catalytic chain / glucose metabolism	0.09
ADH4 ^{\$}	alcohol dehydrogenase 4/ retinoid and alcohol metabolism	0.13
HAO2*	hydroxyacid oxidase 2 / fatty acid oxidation	0.17
HMGCS2 ^{\$}	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2 /ketone bodies synthesis	0.19
CYP2E1	cytochrome P450 2E1/ alcohol metabolism	0.19
SLC2A2*	solute carrier family 7, (facilitated glucose transporter) member 2	0.21
ADH1A	alcohol dehydrogenase 1A/ retinoid and alcohol metabolism	0.28
ADH1B	alcohol dehydrogenase 1B / retinoid and alcohol metabolism	0.33
ADH1C	alcohol dehydrogenase 1C/ retinoid and alcohol metabolism	0.38
HSD17B6	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 6 homolog / retinoid metabolism	0.41

Genes in bold, *, and ^{\$}, were found to be differentially expressed in cells exposed to the mixture, to TCDD alone or the mixture or to all 3 treatments, respectively by t-test analysis. CYP2E1 was found to be altered following treatment with α -endosulfan alone and the mixture by t-test analysis. The values are the fold change by the combination compared to the control condition. Up-regulated and down-regulated genes show fold changes >1 and <1, respectively, as compared to the control condition.

Table 6
Comparison of the changes in the expression of selected target genes by microarray and RT-qPCR analysis

Gene symbol	Gene name	mRNA fold change					
		TCDD		α -endosulfan		combination	
		μ array	RT-qPCR	μ array	RT-qPCR	μ array	RT-qPCR
ADH1A	alcohol dehydrogenase 1A (class I), alpha polypeptide	0.6	0.40	0.55	0.18	0.28	0.09
ADH1B	alcohol dehydrogenase 1B (class I), beta polypeptide	0.65	0.32	0.67	0.44	0.33	0.13
ADH1C	alcohol dehydrogenase 1C (class I), gamma polypeptide	0.55	0.41	0.68	1.48	0.37	0.57
ADH4	alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide	0.38	0.29	0.40	0.28	0.13	0.08
ADH6	alcohol dehydrogenase 6 (class V)	0.56	0.49	0.65	0.62	0.35	0.29
CYP2E1	cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1	0.51	0.41	0.49	0.34	0.20	0.10
CYP1A1	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	37.55	69.13	1.30	0.86	38.48	54.10
SERPINB2	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	26.31	55.03	1.48	1.26	39.25	56.18
STC2	stanniocalcin 2	29.56	47.08	0.63	1.09	43.20	80.76
SLC7A11	solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 11	2.36	2.54	1.91	1.28	3.73	3.25
DTL	denticleless homolog (Drosophila)	1.39	1.82	1.73	1.69	2.97	2.87
SLC9A9	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 9	2.1	2.24	1.28	0.96	2.73	2.52
ABCG8	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 8	0.47	0.53	0.78	0.88	0.33	0.36
ALDH3A1	aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1	6.47	22.58	0.92	1.12	5.88	17.9
AFM	afamin	0.5	0.45	0.48	0.35	0.27	0.21
AQP9	aquaporin 9	0.53	0.44	0.97	0.87	0.48	0.4
GPX2	glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)	1.34	1.55	2.35	3.16	2.05	2.76
MBL2	mannose-binding lectin (protein C) 2, soluble (opsonic defect)	5.89	11.45	0.67	0.93	5.14	9.27
SLC22A7	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 7	0.48	0.41	0.61	0.49	0.28	0.20
SLC38A4	solute carrier family 38, member 4	0.44	0.44	0.59	0.46	0.26	0.20
G6PC	glucose-6-phosphatase, catalytic subunit	0.23	0.18	0.38	0.23	0.09	0.04
SDS	serine dehydratase	0.39	0.23	6.37	5.76	1.66	1.37
HMGCS2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 (mitochondrial)	0.50	0.40	0.46	0.28	0.19	0.08

GDF15	growth differentiation factor 15	2.81	3.43	1.38	0.94	3.55	5.01
NEIL3	nei endonuclease VIII-like 3 (E. coli)	1.69	1.56	1.92	1.34	2.62	2.25
HAO2	hydroxyacid oxidase 2 (long chain)	0.34	0.12	0.64	0.28	0.17	0.04
SLC2A2	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2	0.38	0.26	0.69	0.45	0.21	0.12
CA12	carbonic anhydrase XII	1.73	1.57	1.61	1.01	2.45	2.09
CYP7A1	cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1	0.66	0.56	0.28	0.27	0.21	0.27
PON1	paraoxonase 1	0.64	0.53	0.75	0.54	0.45	0.33
SULT2A1	sulfotransferase family, cytosolic, 2A, dehydroepiandrosterone (DHEA)- preferring, member 1	0.63	0.49	0.93	0.7	0.52	0.34

The mRNA fold change for each gene corresponds to the ratio of mRNA expression for cells exposed to each treatment (25nM TCDD or 10 μ M α -endosulfan or their combination) versus that for untreated cells (0.15% DMSO). The values (fold change >1 for up-regulated genes or < 1 for down-regulated genes) are the means of three microarray or three or more independent RT-qPCR experiments.

Table 7

Top canonical pathways regulated in cells exposed to the combination of TCDD and α -endosulfan

Name of pathway	p-value	ratio^a
by Up-regulated genes		
Pyrimidine metabolism	2.05 E-07	18/231
Role of CHK proteins in cell cycle checkpoint control	2.05 E-06	8/35
RAN signaling	4.82 E-05	5/23
AhR signaling	6.96 E-05	13/154
Molecular mechanisms of cancer	1.10 E-04	22/372
by Down-regulated genes		
FXR/RXR activation	3.31 E-14	12/103
Bile acid biosynthesis	4.99 E-09	7/100
Metabolism of xenobiotics by CYPs	2.52 E-08	9/209
Glycolysis/Gluconeogenesis	4.90 E-08	8/142
Glycerolipid metabolism	8.42 E-08	8/156

^aThe ratio corresponds to the number of genes regulated by the combination of TCDD plus α -endosulfan as compared to the total number of genes in the specific pathway, found by the Ingenuity Pathway Analysis.

Table 8

Genes belonging to the top down-regulated network in cells exposed to the combination of TCDD and α -endosulfan treatment

Gene symbol	Gene name	mRNA fold-change		
		TCDD	α -endosulfan	combination
G6PC	glucose-6-phosphatase, catalytic subunit	0.23	0.38	0.009
ADH4	alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide	0.38	0.40	0.13
RDH16	retinol dehydrogenase 16 (all-trans)	0.31	0.55	0.16
HAO2	hydroxyacid oxidase 2 (long chain)	0.34	0.64	0.17
CYP7A1	cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1	0.65	0.28	0.21
CPS1	carbamoyl-phosphate synthetase 1, mitochondrial	0.35	0.47	0.22
ABCG5	ATP-binding cassette, subfamily G (WHITE), member 5	0.43	0.62	0.30
UGT2B17	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B17	0.69	0.57	0.31
ABCG8	ATP-binding cassette, subfamily G (WHITE), member 8	0.47	0.78	0.33
ADH1C	alcohol dehydrogenase 1C (class I), gamma polypeptide	0.55	0.68	0.37
PON1	paraoxonase 1	0.63	0.75	0.48

All the genes listed belong to the top down-regulated network, lipid metabolism. The mRNA fold change for each gene (fold change >1 for up-regulated genes or < 1 for down-regulated genes) corresponds to the ratio of mRNA expression for cells exposed to each treatment (25nM TCDD or 10 μ M α -endosulfan or their combination) versus untreated cells (0.15% DMSO). The values are the means of three microarray experiments. All the genes are significantly differentially expressed with $p < 0.05$ by Fisher t-test analysis. The values for gene expression following treatment with TCDD or α -endosulfan alone are shown for comparison.

1.2 Conclusion

Cette étude a permis d'évaluer les effets du co-traitement par les POPs, TCDD et α -endosulfan sur l'expression des gènes dans les cellules HepaRG.

La première étude statistique, utilisant le test t avec un fold $\leq$ ou $\geq$ à $|2|$ et une p-value ≤ 0.05 , a montré que la TCDD pouvait réguler 98 gènes. Les résultats sont présentés dans le diagramme de Euler (figure 2 de l'article). Dans ces 98 gènes, 21 sont régulés exclusivement par la TCDD (bleu), un seul est aussi régulé par l' α -endosulfan (blanc), Il y en a 6 qui sont régulés par tous les traitements (jaune), que ce soit les polluants seuls ou le mélange. Enfin, 70 gènes sont régulés à la fois par la TCDD et par le mélange (vert). Vingt trois gènes sont modifiés par le traitement à l' α -endosulfan. La régulation de 10 gènes de ce groupe n'est due qu'à l' α endosulfan (rose foncé). Six gènes sont régulés à la fois par le mélange et par le pesticide (bleu clair). Le mélange régule 182 gènes en tout. Quatre vingt deux de ces gènes ont été décrits plus haut comme étant aussi régulés par la TCDD seule ou par l' α -endosulfan seul (vert, jaune, bleu clair). Il reste donc 100 gènes qui ne sont régulés que par le mélange (rose).

La seconde analyse, effectuée par le logiciel Focus (fold $\leq$ ou $\geq |1.2|$, p-value ≤ 0.05), moins stringente, a permis de donner un rang aux gènes qui sont plus fortement régulés par le mélange par rapport aux POPs seuls ou à la condition contrôle. Par cette analyse, le nombre total de gènes dont l'expression est modulée par le mélange est alors de 662 (558 gènes sur-exprimés et 104 sous-exprimés). La liste des 20 gènes les plus régulés est en bon accord avec les résultats obtenus par l'analyse en conditions stringentes (t-test). Le logiciel Ingenuity a permis de classer ces gènes régulés par voies métaboliques. Les cinq voies métaboliques qui sont augmentées par le mélange sont celle du métabolisme des pyrimidines, des protéines Chk dans le contrôle du cycle cellulaire, la signalisation de RAN, la signalisation du AhR et enfin les mécanismes moléculaires des cancers. Les voies métaboliques diminuées par le mélange sont celles de l'activation du FXR/RXR, de la biosynthèse des acides biliaires, du métabolisme des xénobiotiques par les CYPs, de la glycolyse/ néoglucogenèse et du métabolisme des glycérolipides.

Certains gènes identifiés par l'étude du transcriptome ont été étudiés par RT-qPCR. Cette technique a montré des régulations très similaires à celles trouvées dans l'analyse transcriptomique. Pour certains gènes, comme l'ADH1 (Alcool Déshydrogénase 1), nous avons retrouvé la régulation des gènes au niveau de la quantité de protéine après 72h de traitement.

Afin de déterminer les cibles régulées différemment par le mélange, il a volontairement été

choisi d'utiliser des doses élevées pour la TCDD 25nM et l' α -endosulfan 10 μ M dans l'étude transcriptomique. Par la suite, ces doses ont été diminuées pour se rapprocher de l'exposition réelle de l'Homme. Après un traitement de 8 jours par la TCDD 0.2 ; 0.5 ; 1 ; ou 5nM, par l' α -endosulfan, 1 μ M, ou par les différents mélanges, nous observons que l'expression des gènes est significativement altérée, selon le gène et la dose considérés, et ce de manière plus importante par certains mélanges, par rapport aux polluants seuls.

Les différents mélanges, qu'ils soient à fortes doses pendant un temps court ou à faibles doses pendant un temps long, ont des effets plus importants par rapport aux polluants seuls dans les mêmes conditions. Il est impossible de conclure sur l'effet du mélange comme étant additif, synergique ou antagoniste, même si les résultats obtenus semblent en faveur d'un effet additif pour une majorité de gènes.

Le métabolisme du glucose étant l'un des plus touchés, notamment par des diminutions d'expression de 80 à 90% des ARNm de la glucose-6-phosphatase, sous-unité catalytique (G6Pc), dernière enzyme de la voie de la néoglucogenèse ainsi que du transporteur de glucose 2 (Glut 2 ou SLC2A2), nous avons réalisé une étude spécifique de ce métabolisme après action des polluants, qui est présentée dans la seconde partie de la thèse.

Chapitre 2

Etude n°2 : un mélange de POP diminue la néoglucogenèse et la glycolyse dans la lignée hépatique humaine HepaRG

2.1 Introduction

L'étude du transcriptome précédemment évoquée (chapitre 1) a permis de mettre en évidence une forte diminution, voire l'inhibition presque totale, de l'expression de certains ARNm de la voie métabolique du glucose par le mélange des POPs, TCDD et α -endosulfan, alors que l'effet de chaque polluant seul restait modeste.

Dans un premier temps, toujours dans le modèle des cellules HepaRG différenciées, nous avons analysé les effets de la TCDD, de l' α -endosulfan ou du mélange sur l'expression des ARNm d'enzymes clefs du métabolisme du glucose, c'est-à-dire sur des enzymes appartenant à la voie de la néoglucogenèse (G6Pc, Fructose 1,6 bisphosphatase : FBP, Pyruvate Carboxylase : PC, Phosphoénolpyruvate carboxykinase mitochondriale : PCK2), à la voie de la glycolyse (Hexokinase 2 : HK2, Liver Pyruvate Kinase : PKLR, Pyruvate Déshydrogénase Kinase 2 et 4 : PDK 2 et 4) et à la voie du glycogène (Glycogène Synthase 2 : GYS2, Glycogène Phosphorylase liver : PGYL), mais aussi sur le transporteur de glucose Glut2. Les premières expériences ont été réalisées dans des conditions "néoglucogéniques", c'est-à-dire que durant les 30h de traitement, les cellules ont été mises dans le milieu "normal" de culture (milieu Williams contenant 2 g l^{-1} de glucose) pendant les premières 24h en présence des polluants, puis dans un milieu "néoglu-

cogénique", sans glucose, contenant du lactate, du pyruvate et de la glutamine pendant les 6 dernières heures. Les mêmes expériences ont été effectuées dans des conditions "glycolytiques", c'est-à-dire que les cellules ont été incubées 30h dans le milieu "normal", contenant 2g/L de glucose. Les polluants, les doses et le temps de traitement utilisés sont les mêmes que dans l'étude du transcriptome, à savoir 25nM de TCDD, 10 μ M d' α -endosulfan ou le mélange, pendant 30h. Ces expériences en conditions différentes, "néoglucogéniques" ou "glycolytiques", vont nous permettre de déterminer si la modification d'expression de certains ARNm est influencée par le contexte énergétique des cellules ou elle est due uniquement à l'effet des polluants.

Afin de déterminer si les modifications d'expression observées sur les ARNm ont un effet sur le fonctionnement de la cellule, nous avons effectué différentes études de flux. Le flux néoglucogénique a été évalué en mesurant la quantité de glucose libérée dans le surnageant des cellules pendant 6h, dans un milieu dépourvu de glucose et contenant du lactate, du pyruvate et de la glutamine. Le flux glycolytique a été étudié en utilisant du glucose radio marqué par du Carbone 14, remplaçant la totalité des carbones du glucose. Le CO₂ libéré par le cycle de Krebs a été piégé et la radioactivité correspondante a été mesurée. Ce flux glycolytique correspond en réalité à la glycolyse aérobie, c'est-à-dire à la glycolyse puis au cycle de Krebs. Il existe la glycolyse anaérobie, qui ne s'effectue qu'en condition pauvre en oxygène, et dont la molécule finale est le lactate et non le pyruvate. Cette glycolyse anaérobie a aussi été étudiée. Toutes les expériences de flux ont été réalisées après 72h de traitement par les polluants.

Des expériences de cinétique nous permettent d'apprécier si les effets des POP sont des effets "rapides ou lents". Ensuite, des traitements "sub-chroniques" des cellules HepaRG, avec des doses de 0.2 ; 0.5 ; 1 ou 5nM pour la TCDD et de 3 ou 10 μ M pour l' α -endosulfan, ont été effectuées. Les cellules ont été traitées pendant 8 jours au lieu de 30h pour l'étude des ARNm. Ces cellules ayant la capacité de rester différenciées pendant 4 semaines minimum [Jossé et al., 2008], ce type d'expérience est possible. Enfin, nous avons voulu déterminer quels étaient les voies de signalisation utilisées par les polluants. Pour cela, nous avons effectué des expériences d'ARN interférence. Nous avons étudié les effets des siRNA utilisés soit directement sur l'expression des ARNm, soit sur le flux néoglucogénique.

A mixture of persistent organic pollutants decreases gluconeogenesis and glucose oxidation in the human hepatic cell line HepaRG

Alix Leblanc^{1, 2}, Eléonore Attignon^{1, 2}, Sylvie Bortoli^{1, 2}, Chantal Benelli^{1, 2}, Robert Barouki^{1, 2, 3}, Etienne Blanc^{1, 2}, Xavier Coumoul^{1, 2*} and Martine Aggerbeck^{1, 2*}

¹ INSERM UMR-S 1124, Toxicologie Pharmacologie et Signalisation Cellulaire, 45 rue des Saints Pères, 75006 Paris, France.

² Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Centre universitaire des Saints-Pères, 45 rue des Saints Pères, 75006 Paris, France

³ AP-HP, Hôpital Necker-Enfants Malades, service de biochimie métabolique, 149, rue de Sèvres, 75743 Paris, France

* Corresponding author :

Martine Aggerbeck

E-mail : martine.aggerbeck@parisdescartes.fr

Telephone: (33) 142862093

Fax: (33) 142863868

Abstract

Both humans and entire ecosystems are exposed to mixtures of Persistent Organic Pollutants (POPs). Among POPs, are both pesticides and polyaromatic hydrocarbons, such as dioxins. Previously, we showed by a non-targeted approach that several genes involved in carbohydrate metabolism were almost completely inhibited in the human hepatic cell line HepaRG following exposure to a mixture of the pesticide alpha-endosulfan and tetrachlorodibenzo-p-dioxin. In this HEALS study, we investigated the effect of these POPs on glucose output and glucose oxidation into CO₂ as correlated to carbohydrate metabolism gene expression measured by RT-qPCR in HepaRG cells. Exposure to the mixture led to decreases in both glucose output (up to 82%) and glucose oxidation (up to 36%). Specific inhibition using siRNAs demonstrated that the aryl hydrocarbon receptor mediated the dioxin effect and that the estrogen receptor was involved partially in the pesticide effect but neither the pregnane X receptor nor the constitutively androstane activated receptor played a role in the alpha-endosulfan effect. The results provide evidence that exposure to combinations of POPs, acting through different signalling pathways may affect, more profoundly than single pollutants alone, metabolic pathways such as carbohydrate metabolism, with a potential role in pollutant associated metabolic disorders.

Key words: pesticide, carbohydrate metabolism, dioxin, alpha-endosulfan, mixture, liver

Introduction

Environmental contaminants are released daily into the environment, mainly by humans due to industrial, agricultural and urban activities. Living organisms, thus, are exposed to these contaminants throughout their lives and this persistent exposure has become a major issue for both public health policy and ecosystem management (EFSA 2008). Among these contaminants, persistent organic pollutants (POPs) raise specific concerns since they resist degradation, persist in the environment for long periods of time, are carried by winds and ocean streams and are found even in isolated or distant areas such as the Arctic and Antarctic or mountain tops. They accumulate throughout the food chain because of their lipophilicity and they are stored in adipose tissues. Moreover, several of the POPs act as endocrine disruptors and, thus, may modify the normal physiology of the contaminated organism. Increasing epidemiological and toxicological evidence suggest that POPs can contribute (along with other obvious factors such as sedentary lifestyle and diet) to the increase in incidence of several chronic pathologies and conditions including some cancers, neurodegenerative disorders, reduced fertility, the metabolic syndrome, diabetes and obesity, both in western and emerging countries (Alavanja et al., 2004; Kamel, 2013; Lee et al., 2011, 2011; Magliano et al., 2014).

Whereas the effects of some members of each family of these contaminants have been studied extensively alone, little is known about the effects of combinations of POPs, with the notable exception of those which are “dioxin-like” and, therefore, share the same mechanism of action, i.e. activation of the Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) (Desaulniers et al., 2005; Howard et al., 2010; Thayer et al., 2012) or some pesticides (Nawaz et al., 2014; Perobelli et al., 2010; Savary et al., 2014). Since the general population is exposed to low levels of complex mixtures of such pollutants, many of which act through different pathways, more

attention needs to be paid to the effects of combinations of such pollutants on human health (Kortenkamp et al., 2007). Indeed, determination of the toxicity of complex combinations of pollutants, especially POPs, has become a challenge for modern toxicology. Thus, recently, several studies have focused on the effects of complex mixtures in various models (De Boever et al., 2013; Lyche et al., 2013). In humans, the liver is the primary target organ as well as a storage site of POPs (U.S. EPA, 2007, 2012; Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2013). Many studies use animal models, especially rodents, to unravel the pathological effects due to the contamination by such pollutants but these models imperfectly reflect the human species.

For this study, we used the human liver-derived cell line, HepaRG. This cell line is a recognized model for the human hepatocyte for the study of both drug metabolism (Anthérieu et al., 2010) and intermediary metabolism (Rogue et al., 2012; Samanez et al., 2012). Indeed, this cell line expresses numerous genes which encode important proteins involved in carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and glycolysis, as well as in lipid and lipoprotein metabolism. After differentiation, they express high levels of xenobiotic metabolizing enzymes and xenosensors (Guillouzo et al., 2007) the expression of which remains stable for several weeks (Kanebratt and Andersson, 2008) and the possibility of long-term maintenance under serum-free conditions has been described recently (Klein et al., 2014).

Here we studied two POPs which are also endocrine disruptors, 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and α -endosulfan, the most toxic isomer of this organochlorine (OC) pesticide, because they have distinct mechanisms of action and can bioaccumulate in organisms. TCDD is a well known activator of the AhR signaling pathway (Barouki et al., 2007) which exerts its effects at nanomolar concentrations. Alpha-endosulfan has been described as an activator of either the pregnane X receptor (PXR) or the estrogen receptor (ER) (Casabar et al., 2010; Coumoul et al., 2001, 2002). OC pesticides are among the

most frequent contaminants in the environment and endosulfan, in spite of its restriction and ban in the European Union, is still in use in China and India and thus, residues are still detected in various foods (EFSA, 2008). We previously showed, in a non-targeted study, that the combination of TCDD and α -endosulfan drastically decreases the expression of several genes involved in carbohydrate metabolism pathways in HepaRG cells (Ambolet-Camoit et al. submitted for publication). However, neither the metabolic consequences of these effects on intermediary metabolism, nor the contribution of each contaminant in this deregulation is known. Therefore, we investigated the consequences of the down-regulation of the genes involved in the carbohydrate metabolism on metabolism of these cells. In this study, we demonstrate that the treatment of the cells by the mixture of pollutants decreases glucose output, through the decrease in the level of mRNA of key enzymes involved in gluconeogenesis as well as through a decrease in the oxidation of glucose. We show that the AhR/ARNT (aryl hydrocarbon receptor/AhR nuclear translocator) pathway is involved in the effect of TCDD and that α -endosulfan acts, at least in part, through the estrogen receptor (ER). However, we found no evidence for involvement of the PXR or the constitutive androstane receptor (CAR) xenosensors in the HepaRG cellular model.

Materials and methods

Cell culture

Human hepatoma HepaRG cells (kindly obtained from Dr C. Guguen-Guillouzo, Rennes, France) were cultured at 37°C in William's E medium (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (HyClone™ FetalClone™ III), 100 units/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin (Gibco, 15070-063), 5µg/mL insulin (Sigma, H2270), 2mM glutamine (Gibco) and 50µM hydrocortisone hemisuccinate (Upjohn Pharmacia or Gibco, France) (hereafter called complete Williams' E medium) in a humidified atmosphere in 5% CO₂ (Aninat et al.,

2006). The cells were seeded at a density of 2.7×10^4 cells/cm². After 2 weeks, they were shifted to the same medium supplemented with 1.5% DMSO during 2 weeks (for differentiation). The medium was changed every 2 to 3 days. Before the treatments, the HepaRG cells were trypsinized and seeded at a density of either 1.3×10^6 cells/wells in 6-well plates or 6.6×10^5 cells/wells in 12-well plates. The differentiated cells were treated with 25nM TCDD, 10 μ M α -endosulfan or the mixture, for 30h and 72h to study, respectively, the expression of mRNA and protein.

For mRNA extraction and studies of metabolic flux under “gluconeogenic” conditions, cells were initially cultivated in complete Williams’ E medium and exposed to the POPs for, respectively, 24h (for mRNA) and 66h (for metabolic flux). The cells then were shifted to a gluconeogenic medium, containing the POPs, for the last 6h (DMEM (Sigma D5030) + NaHCO₃ (44mM) containing 2mM of glutamine, 10 mM Hepes pH 7.4, 10nM hydrocortisone hemisuccinate (Gibco), 10 mM lactate (Sigma L-7022) and 1mM sodium pyruvate (Sigma P-5280)). In other experiments, the differentiated HepaRG cells were exposed to lower doses of TCDD (0.1 to 5nM), α -endosulfan (1 to 10 μ M) or the mixture at days 0 and 4 and the cells were harvested at day 8.

Glucose production assay

Differentiated HepaRG cells were seeded into 6-well plates. After 66h of exposure to the POPs in complete Williams’ E medium, the cells were washed with PBS and incubated in a “gluconeogenic” medium (DMEM without phenol red, glucose, sodium pyruvate, glutamine and NaHCO₃ (Sigma D5030) supplemented with 44mM NaHCO₃, 0.2mM Glutamine, 10mM Hepes, 10mM lactate, 1mM sodium pyruvate, 10nM hydrocortisone). After 6h of incubation in this medium in the presence of the pollutants, the supernatant was collected and glucose production was measured with the Glucose (GO) Assay kit (Gago-2) from Sigma. Proteins

were collected in the same wells with RIPA buffer and their concentration measured as previously described (Blouin et al., 2011).

Measurement of glucose oxidation

Differentiated HepaRG cells were seeded into 6-well plates and cultured in the complete Williams' E medium (containing 11mM glucose). After 72h of exposure to the POPs, the cells were washed with PBS, trypsinized, resuspended in the complete Williams' E medium and counted. The cells were centrifuged and resuspended in Krebs-Ringer phosphate buffer to obtain 2 million cells in 950µL. The cells were then incubated for 90 min at 37°C in a total volume of 1 mL of Krebs-Ringer phosphate buffer, containing 5mM U-¹⁴C-glucose (250µCi/µmol) at an isotopic dilution of 1/1,000 in a vial with a cupule holding a 1MM Whatman paper. The reaction was stopped by the addition of 200µL of 3M sulfuric acid and the ¹⁴CO₂ produced from U-¹⁴C-glucose was recovered on a Whatman 1MM paper after addition of 200µL of a 1M methyl-benzethonium hydroxide solution (Sigma) on the paper for 1h at room temperature. The ¹⁴CO₂ was counted in a liquid scintillation counter in 5mL Ultimagold (Blouin et al., 2011). The amount of protein, for each condition, was measured as described above.

Measurement of lactate

Cells were seeded in 24 well-plates. After 72h of treatment in the complete Williams' E medium, the cells were washed with PBS, and incubated for 2h with Krebs medium containing 11mM glucose. Lactate was measured in the supernatant by a fluorimetric assay according to Passonneau and Lowry, as described by Lopes Costa et al. (Lopes Costa et al., 2014). The amount of protein, for each condition, was measured as described above and used to normalize the lactate production.

Time course experiments

The cells were seeded into 12-well plates. Seventy-two hours later, the complete Williams' E medium was replaced and cells were exposed or not to 25nM TCDD, 10 μ M α -endosulfan or the mixture for 4, 8, 16 or 30 hours prior to preparation of RNA.

siRNA transfection.

siRNAs (On-target plus Smart pool) were purchased from Dharmacon (Thermo Scientific: SiControl: #D-001810-10-05; SiAhR: #L-003175-00; SiPXR (SiNR1I2): #L-003415-00; SiER α (siESR1): #L-003401-00; SiCAR (SiNR1I3): #L-003416-00. Differentiated HepaRG cells were seeded into 12-well plates and transfected with 4nM siRNA, using RNAimax (Life Technologies), according to the manufacturer's protocol. Seventy-two hours later, the medium was replaced and cells were exposed or not to 25nM TCDD, 10 μ M α -endosulfan or to the mixture. Purification of RNA was carried out 30h after the treatments.

RNA isolation

Total RNAs were extracted from the cells using the RNeasy Mini Kit (Qiagen), and the RNA quantity and purity were assessed with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer, as previously described (Bui et al., 2009).

Reverse Transcription and quantitative PCR

One μ g of total RNA was reverse transcribed into cDNA in a final reaction volume of 20 μ L as described (Pierre et al., 2014). Oligonucleotides were designed using the OLIGO Explorer software (Table 1). Quantitative PCR was carried out with 20ng of the cDNA, 100 nM of each primer and Absolute QPCR SYBR Green (Abgene, Villebon sur Yvette, France) in a final volume of 10 μ L. Measurements were performed using an ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) as previously described (Bui). The relative

level of mRNA was estimated with the delta-delta C_t method using, respectively, RPL13A as the reference gene.

Results

Exposure to TCDD and α -endosulfan decreases both glucose production and expression of genes coding for enzymes involved in glucose metabolism under “gluconeogenic” conditions

Using a non-targeted whole genome transcriptome analysis, we showed that the expression of several genes which encode proteins that are involved in carbohydrate metabolism was modified in HepaRG cells, cultivated in complete Williams'E medium (containing 11mM of glucose, “glycolytic” conditions), following exposure for 30h to a combination of 25nM TCDD and 10 μ M α endosulfan whereas each pollutant alone had a smaller or no effect (Ambolet-Camoit et al, submitted). In particular, we found decreased expression of the bidirectional glucose transporter, GLUT2 (SLC2A2) and the Glucose 6 Phosphatase catalytic subunit (G6PC), the last enzyme in gluconeogenesis (decreased by 90%). No toxicity to the HepaRG cells was detected for this amount of POP exposure (Ambolet-Camoit et al, submitted).

Since G6Pc is a critical enzyme of the gluconeogenic pathway, we investigated the molecular and metabolic effects of 25nM TCDD, 10 μ M α -endosulfan or the mixture on HepaRG cells cultivated under “gluconeogenic” conditions. To this end, the cells were exposed to the pollutants for 24h in the complete Williams' E medium and, then, for the last 6 hours, they were shifted to a “gluconeogenic” medium that lacked glucose but contained a combination of lactate, pyruvate and glutamine as gluconeogenic substrates. The expression of G6PC decreased with all the treatments. However, the decrease in expression was

significantly more pronounced with the mixture (90%) as opposed to TCDD or α -endosulfan alone (55% and 75% decrease, respectively) (Figure 1A). Under these conditions, GLUT2 mRNA expression also decreased with all the treatments (up to 70% with the mixture, Figure 1B). Therefore, the repression of these 2 genes does not appear to be altered by “gluconeogenic” or “glycolytic” conditions of the medium.

We then measured the production of glucose, using a combination of pyruvate, glutamine and lactate as substrates. The cells were incubated in the complete Williams'E medium for 66 hours and exposed or not to the pollutants. Then, the medium was replaced for the last 6 hours with a “gluconeogenic” medium also containing the pollutants. Glucose production was found to be decreased by 76%, 74% and 82%, respectively, following exposure to TCDD, α -endosulfan or the mixture as compared to cells cultivated in the absence of the pollutants (Figure 1C).

We next examined the expression of other major enzymes involved in gluconeogenesis and in the other major carbohydrate metabolism pathways (Table 2). We found that in the gluconeogenic pathway, mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCK2) (Stark et al., 2014) gene expression was decreased by all the treatments (up to 70% by the mixture) in addition to GLUT2 and G6PC. Gluconeogenesis was not the only affected carbohydrate pathway. In the glycolysis pathway, hexokinase 2 (HK2) expression was increased by TCDD and the mixture, whereas liver pyruvate kinase (PKLR) and pyruvate dehydrogenase kinase 2 (PDK2) expressions were significantly decreased with all the treatments. The expression of glycogen synthase 2 (GYS2), belonging to the glycogen synthesis pathway, also was decreased following exposure to either TCDD or the mixture.

TCDD and α -endosulfan disrupt the expression of genes involved in carbohydrate metabolism and glucose oxidation under “glycolytic” conditions

In light of the effects of the POPs and their mixture on the expression of several enzymes belonging to the carbohydrate metabolism under “gluconeogenic” culture conditions, we then investigated these effects under “glycolytic” culture conditions. When HepaRG cells were cultivated in the presence of 11mM glucose (complete William’s E medium) and exposed for 30h to TCDD, α -endosulfan, or the mixture, GLUT2 expression decreased by 70, 50 or 90%, respectively (Figure 2A). Under the same culture conditions, we found that exposure to the POPs or their mixture altered the expression of the same genes involved in gluconeogenesis (GLUT2, G6PC, and PCK2), glycolysis (HK2, L-PK and PDHK2) and glycogenesis (GS2) as under “gluconeogenic” culture conditions (Table 2). Because the expression of both PKLR and the multidirectional GLUT2 transporter were decreased up to 78 and 90%, respectively, after exposure to the POPs under “glycolytic” culture conditions (11mM glucose), we assessed the effects of these treatments on the oxidative capacities of HepaRG cells by measuring the release of radioactive CO₂ from radioactive glucose via the Krebs cycle. We found that exposure of the cells to TCDD did not modify their glucose oxidation. In contrast, exposure of the cells to α -endosulfan or to the mixture of POPs led to decreases of CO₂ production of 20 and 36%, respectively, as compared to the unexposed cells (Figure 2B). Since the decrease of aerobic oxidation could increase the level of lactate in the cells, we measured lactate concentration after the various treatments. There was, however, no significant modification in level of lactate following exposure to either POP or to the mixture (Figure 2C).

Since we observed the same effects on gene expression using culture medium that contained or lacked glucose, we used the complete Williams’ E medium (11mM glucose), traditionally used for the culture of the HepaRG cell line, for the remainder of the experiments.

The effects of pollutants on G6PC and GLUT2 were time-dependent

HepaRG cells were exposed to 25nM TCDD, 10 μ M α -endosulfan or to their combination for 4, 8, 16 or 30 hours. No significant modification of the expression of either the G6PC or the GLUT2 was found after 4h of treatment. However, significant decreases in the expression of G6PC were observed as early as 8h after exposure (70% for TCDD, 60% for α -endosulfan and 80% for the mixture, Figure 3A). A significant decrease in the expression of GLUT2 was also observed 8h following exposure to the POPs individually or to their mixture (Figure 3B).

“Semi-chronic” treatments of HepaRG cells with low concentrations of pollutants have the same effects as the acute treatment

Since differentiated HepaRG cells can be maintained in culture for at least 4 weeks without changes in the expression of several enzymes and receptors (Jossé et al., 2008), we investigated the effect of exposure to low doses of the POPs for one week. No toxicity was observed under the treatment conditions (Ambolet-Camoit et al, submitted). HepaRG cells were exposed for 8 days to lower doses of the pollutants: 0.2, 0.5, 1 or 5 nM TCDD, and 3 μ M for α -endosulfan alone and to mixtures of TCDD (0.2, 0.5, 1 or 5 nM) with 3 μ M α -endosulfan. Remarkably, G6Pc mRNA expression decreased 50% and 40%, respectively for the lowest concentrations of TCDD (0.2nM) and α -endosulfan (3 μ M) that were tested. Exposure to mixtures (0.5nM TCDD + 3 μ M α -endosulfan, 1nM TCDD or 5nM TCDD + 10 μ M α -endosulfan) resulted in a statistically significant greater decrease in the G6PC expression as compared to the decreased following exposure to either pollutant alone (Figure 4A). With the other mixtures, the decreases observed were due mostly to the effects of TCDD under this “semi-chronic” exposure.

The expression of GLUT2 also was decreased up to 45% following exposure of HepaRG cells to low doses of TCDD (from 0.2 to 5nM) and up to 40% following exposure to

3 or 10 μ M of α -endosulfan. A decrease in expression that was significantly more pronounced (as compared to either POP alone) was apparent following exposure to only some of the mixtures of POPs. In the other instances, the effect of the mixture seemed to result from TCDD alone (Figure 4B).

We then tried even lower concentrations of the POPs. G6PC expression was decreased 40% and GLUT2 expression 30% following exposure of cells to 0.1nM TCDD (data not shown). Exposure of cells to 1 μ M of α -endosulfan gave a decrease of 35% in G6PC expression but there was no modification in GLUT2 expression (data not shown). For all the different mixtures of TCDD with 1 μ M α -endosulfan, the decreases observed appeared to reflect the effects of TCDD (data not shown).

The TCDD induced repression of G6PC and GLUT2 is mediated through the AhR

TCDD is known to activate the AhR/ARNT pathway. Therefore, we selectively down-regulated the expression of the AhR transcription factor by RNA-interference assay to verify the implication of the AhR in the effects observed following treatment with TCDD. Upon transfection with an siRNA directed against AhR, the expression of AhR was almost completely abolished in HepaRG cells, whether or not they had been exposed to TCDD (Figure 5A). The decrease in the expression of AhR was accompanied by the loss (although only partial) of the effect of TCDD on the expression of both G6PC and GLUT2 as compared to the siRNA control condition (Figure 5B/C). The inhibition in expression of G6PC and GLUT2 following exposure to TCDD were 23 and 26%, respectively, in the presence of siAhR as compared to 81 and 69%, respectively, in the presence of the siControl. Thus, it is likely that the effect of TCDD is mediated by the AhR/ARNT pathway.

The α -endosulfan induced repression of G6PC and GLUT2 is partially mediated through the ER

Since α -endosulfan has been described as acting through various pathways, we used siRNA targeting the PXR or ER α . Although PXR expression was decreased effectively by siRNA transfection (Figure 6A), there was no modification of the inhibition of the expression of G6PC and GLUT2 following exposure of cells to α -endosulfan (Figures 6B and C). Therefore, in the HepaRG cell line, the PXR does not seem to mediate the effect of α -endosulfan. We then tested the effect of an siER α . We could not measure a decrease in the expression of ER mRNA after transfection with the siRNA targeting ER. This may be because this mRNA has a level of expression in HepaRG cells that is too low to be measured by qPCR (the levels for estrogen receptors alpha and beta were almost identical and were also found to be very low in our whole genome transcriptome analysis, Ambolet-Camoit et al, submitted). However, we observed that the siRNA targeting the ER α led to a partial loss of the effect of α -endosulfan (Figure 7A and B). Exposure of HepaRG cells to α -endosulfan resulted in a decrease in G6PC expression of 73% in the presence of a control siRNA whereas the decrease in the presence of the siER α was only 42%, as compared to the respective non-treated cells. Surprisingly, the transfection of the siER α led to a 166% increase of the basal level of expression for G6PC, in the absence of the pesticide. In contrast, there was no change in the basal level of expression of GLUT2 following transfection with the siER α as compared to the control siRNA. Further, the siER α eliminated the decrease in expression of GLUT2 normally observed after exposure of cells to α -endosulfan. However, in these experiments the decrease in expression of GLUT2 following exposure of cells to α -endosulfan in the presence of the siControl was only modest. We then verified that another xenosensor, the constitutive androstane activated receptor (CAR) was not involved in the effect of α -endosulfan in our cell model. Using an siRNA targeting CAR, we obtained results similar to those obtained with the siPXR. Although the expression of CAR was decreased in cells transfected with an siCAR (Figure 8A), the expression of both G6PC and GLUT2 remained markedly decreased after

exposure of the cells to α -endosulfan (Figures 8B and C). Thus, the CAR does not seem to mediate the effect of α -endosulfan in the HepaRG cell line.

SiRNA targeting AhR partially prevents the decrease of the glucose production by TCDD

HepaRG cells were transfected with either the control siRNA or the siRNA targeting AhR and, 72h later, they were exposed or not to 25nM TCDD for another 72h. During the last 6h of the experiment, the cells were cultured in a medium lacking glucose, but containing lactate, pyruvate and glutamine as substrates (“gluconeogenic” medium), and the glucose production was measured. Transfection with the siAhR, as compared to transfection with the siControl, did not modify the glucose production in cells that were not exposed to TCDD whereas it partially reversed the decrease in glucose production (78% and 43% inhibition, respectively, with siControl and siAhR) observed after exposure of cells to TCDD (Figure 9A). Then we transfected the cells with either the control siRNA or the siRNA directed against the ER α and performed the same type of experiment. As compared to the transfection with the siControl, transfection with the siER α , in the absence of any other treatment, led to a decrease in glucose production of 53%. Treatment of HepaRG cells with α -endosulfan which had been transfected with either the siControl or the siER α decreased glucose production 80% in both instances, as compared to the glucose output in the absence of siER and α -endosulfan (Figure 9B). Although the data could be interpreted as providing evidence that the ER α is not involved in the effect of α -endosulfan, the level of glucose was very different depending on the siRNA used (control versus ER α) thus making it difficult to draw a definitive conclusion from this experiment on the signaling pathway used by the pesticide.

Discussion/Conclusion

The liver is one of the main organs involved in detoxification of xenobiotics in the human organism and, therefore, it is an important target of these compounds. In the present study, we investigated the effects of a combination of two persistent organic pollutants, an organochlorine pesticide and a dioxin, which act through different signaling receptors, to assess the effect of this mixture on carbohydrate metabolism in the human liver-derived cell line, HepaRG. In a previous non-targeted study of the effects of this mixture of pollutants in this hepatic cell line, we observed drastic reductions of the levels of mRNAs encoding a key enzyme involved in gluconeogenesis, glucose-6-phosphatase and of the bi-directional glucose transporter 2 (SLC2A2). Since there is no data describing the effects of such drastic effects by a mixture of pollutants on glucose metabolism in a human model, we studied their effects, under “gluconeogenic” conditions (the medium contains no glucose but it does contain gluconeogenic substrates), on glucose output and on the levels of expression of several genes belonging to the gluconeogenesis pathway. Under both “gluconeogenic” and “glycolytic” culture conditions, we found that the exposure of the cells to the 2 POPs did not affect the expression of fructose 1,6 bisphosphatase 1 (FBP1), pyruvate carboxylase (PC), pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) and liver glycogen phosphorylase (PYGL) whereas the mRNA levels of G6PC and mitochondrial PEPCK (PCK2), recently described as playing a role in gluconeogenesis (Stark et al., 2014), as well as that of GLUT2 were decreased, albeit not as much as under “glycolytic” conditions. We also observed a reduction of up to 82% in glucose output after exposure of cells to the combination of the POPs. The effect of the POPs on mRNA levels was observed as early as 8 hours after pollutant exposure, probably indicating that synthesis of proteins might not be necessary for the changes that we observed. We tested potential signaling receptors that might be involved in the effects of the contaminants by siRNA interference. As expected, TCDD acted through the AhR/ARNT

pathway, since inhibition of expression of the receptor interfered with the action of TCDD on the level of mRNA and glucose output. In a chick model, the expression of the TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase, PARP7 (TiPARP) is increased after treatment with TCDD, leading to acetylation and proteosomal degradation of the the peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1a (PGC1a) (Diani-Moore et al., 2010). Since PGC1a has been described as a regulator of G6Pc and PEPCCK in mouse hepatocytes (Puigserver et al., 2003), it is likely that TCDD could exert its inhibitory action in the HepaRG human model via the same mechanism. The results related to the mode of action of α -endosulfan were more surprising. Transfection with siRNA directed against PXR, a classical xenosensor described in the literature as being activated by α -endosulfan (Casabar et al., 2010; Coumoul et al., 2002; Savary et al., 2014) did not affect the changes in target gene expression following pollutant exposure in the HepaRG model. Since organochlorine pesticides have been described as endocrine disruptors capable of interacting with the estrogen receptor and because α -endosulfan has been described as activating the ER α in several cellular models (Coumoul et al., 2001; Wong and Matsumura, 2006), we tested the possible involvement of this receptor in the HepaRG model. We found that silencing of the estrogen receptor partially relieved the inhibition of gene expression (for GLUT2 and G6PC) produced by exposure of cells to α -endosulfan. However, ER α silencing decreased the glucose output by 50% in the absence of the pesticide and there was with no further modification of the glucose level after exposure of the cells to α -endosulfan (in siER transfected cells), making the result with the pollutant difficult to interpret. Transfection with siRNA has been shown, in 3T3-F442A adipocytes, to affect metabolic fluxes which might be very sensitive to the cellular context (Cadoudal et al., 2008). However, the involvement of the estrogen receptor, at least partially, in the effect of α -endosulfan in the HepaRG model, appears possible on the basis of a comparison of our results with the whole genome transcriptome analysis by Jennen and coworkers (Jennen et al., 2010)

in which the effect of 30 μ M estradiol (E2) on HepaRG cells was studied. Among the pathways down-regulated in the study by Jennen and co-workers, bile acid biosynthesis, glycolysis and gluconeogenesis, regulation of lipid metabolism-FXR dependent were pathways also down-regulated in our whole genome analysis of gene expression. We, thus, compared the expression of 40 genes which were found to be differentially expression following 30h of exposure to α -endosulfan in our study (Ambolet-Camoit et al, submitted) to the expression of the same genes in the HepaRG cells exposed to E2 for 48h in Jennen's study. We found a moderate correlation, as shown in Figure 10. After exposure of cells to E2 or α -endosulfan, expression of G6PC decreased to 19 and 25%, respectively, of the control value and GLUT2 expression decreased to 31 and 58%, respectively, of the control values. Thus, E2 and α -endosulfan would appear to affect these HepaRG cells in a similar fashion.

In the HepaRG model system, we demonstrated that exposure of cells to the mixture of TCDD and α -endosulfan result in a reduction of both glucose output and glucose oxidation albeit under different energetic conditions of culture. Since the decrease in the expression of the GLUT2 transporter, G6PC, PKLR, as well as the inhibition of glucose output and glucose oxidation by the contaminants might increase the content of G6P in the cell (note that no modification in the lactate content was observed), G6P could be shunted into the oxidative branch of the pentose phosphate pathway (PPP) by glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD). This pathway generates NADPH during the oxidation of G6P into ribose-5-phosphate and thus contributes to protection against oxidative stress by reduction of the glutathione pool. In our whole genome transcriptome analysis, we observed no change in G6PD expression upon exposure of the cells to pollutants (Ambolet-Camoit et al, personal communication). However, this result may not be surprising since most of the regulation of this housekeeping gene seem to be post-transcriptional (Cyphert et al., 2013; Walsh et al.,

2013; Wang et al., 2014). However, in Medaka, a transcriptional regulation by an organophosphorus pesticide has been described (Woo et al., 2009).

It is evident that the HepaRG cell culture model does not reproduce the complexity of the whole organism and, therefore, it is impossible to draw definitive conclusions from this study as to a potential increased risk, for humans arising from exposure to mixtures of POPs, for metabolic syndrome or type 2 diabetes. A recent metabonomic study of mice exposed to a low dose of endosulfan in the diet has revealed that the pesticide modifies the energy metabolism with a gender difference. Interestingly, increased plasma glucose levels were found in both sexes but the relationship to the liver glucose content was different. For the females, the increase in plasma glucose was linked to a decreased hepatic glucose level whereas no such decrease was observed in the males. In the latter case, there was a decreased hepatic lactate level which suggested a decrease in the hepatic glycolytic pathway (Canlet et al., 2013). This study as well as another one concerning the effect of a mixture of pesticides (Merhi et al., 2010) also showed that female and male mice respond differently to a contaminant exposure. However, the animal models (mainly rodents) extrapolate imperfectly to humans, as summarized in a recent reanalysis by the US Environmental Protection Agency for dioxins (US EPA, 2012).

The simultaneous use of human cell and animal models, in conjunction with epidemiological studies and modeling will be necessary to grasp the real risks of exposure to a variety of chemicals for humans. Many epidemiological studies have tried to assess the link between human exposure to contaminants, which occur usually at low levels throughout life, and the increased, epidemic level of the metabolic syndrome and type 2 diabetes (Cranmer et al., 2000; Lee et al., 2011; Magliano et al., 2014; Son et al., 2010). As recently reviewed by Magliano and coworkers for a number of cohorts, no obvious dependent relationship between exposure to POPs and diabetes in the general population is observed whereas most studies on

occupational or non-occupational high risk cohorts suggest an increased risk of diabetes with past exposure to dioxins/PCBs and/or herbicides (Magliano et al., 2014). However, the author also points out that, because of the high prevalence of diabetes and of the inevitable exposure to POPs, even a very small increased risk of disease in susceptible populations would have major public health significance. It is clear that more epidemiological studies will be necessary together with the study of various biological models to decide if a causal link does or not exist between life-long exposure to POPs, such as dioxins and OC pesticides, and the increase of metabolic syndrome and type 2 diabetes in humans. Our study is the first to address the question of the effect of a combination of contaminants acting via different molecular pathways on the carbohydrate metabolism in a human cell model.

Acknowledgements

We thank Dr L. Aggerbeck for critical reading of the manuscript. This work was supported by INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université Paris Descartes, MESR (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche) (doctoral fellowships, Alix Leblanc and Eléonore Attignon). This work has also received funding from the European Union's Seventh Programme for research, technological development and demonstration under grant agreement No 603946 (Health and Environment-wide Associations via Large Population Surveys (HEALS). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

No competing financial interest

References

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2013). Toxicological profile for endosulfan. (Draft for Public Comment) Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- Alavanja, M.C.R., Hoppin, J.A., and Kamel, F. (2004). Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. *Annu. Rev. Public Health* 25, 155–197.
- Aninat, C., Piton, A., Glaise, D., Le Charpentier, T., Langouët, S., Morel, F., Guguen-Guillouzo, C., and Guillouzo, A. (2006). Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 34, 75–83.
- Anthérieu, S., Chesné, C., Li, R., Camus, S., Lahoz, A., Picazo, L., Turpeinen, M., Tolonen, A., Uusitalo, J., Guguen-Guillouzo, C., et al. (2010). Stable expression, activity, and inducibility of cytochromes P450 in differentiated HepaRG cells. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 38, 516–525.
- Barouki, R., Coumoul, X., and Fernandez-Salguero, P.M. (2007). The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Lett.* 581, 3608–3615.
- Blouin, J.-M., Penot, G., Collinet, M., Nacfer, M., Forest, C., Laurent-Puig, P., Coumoul, X., Barouki, R., Benelli, C., and Bortoli, S. (2011). Butyrate elicits a metabolic switch in human colon cancer cells by targeting the pyruvate dehydrogenase complex. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 128, 2591–2601.
- De Boever, P., Wens, B., Boix, J., Felipe, V., and Schoeters, G. (2013). Perinatal exposure to purity-controlled polychlorinated biphenyl 52, 138, or 180 alters toxicogenomic profiles in peripheral blood of rats after 4 months. *Chem. Res. Toxicol.* 26, 1159–1167.
- Bui, L.-C., Tomkiewicz, C., Chevallier, A., Pierre, S., Bats, A.-S., Mota, S., Raingeaud, J., Pierre, J., Diry, M., Transy, C., et al. (2009). Nedd9/Hef1/Cas-L mediates the effects of environmental pollutants on cell migration and plasticity. *Oncogene* 28, 3642–3651.
- Cadoudal, T., Distel, E., Durant, S., Fouque, F., Blouin, J.-M., Collinet, M., Bortoli, S., Forest, C., and Benelli, C. (2008). Pyruvate dehydrogenase kinase 4: regulation by thiazolidinediones and implication in glyceroneogenesis in adipose tissue. *Diabetes* 57, 2272–2279.
- Canlet, C., Tremblay-Franco, M., Gautier, R., Molina, J., Métais, B., Blas-Y Estrada, F., and Gamet-Payrastre, L. (2013). Specific metabolic fingerprint of a dietary exposure to a very low dose of endosulfan. *J. Toxicol.* 2013, 545802.
- Casabar, R.C.T., Das, P.C., Dekrey, G.K., Gardiner, C.S., Cao, Y., Rose, R.L., and Wallace, A.D. (2010). Endosulfan induces CYP2B6 and CYP3A4 by activating the pregnane X receptor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 245, 335–343.
- Coumoul, X., Diry, M., Robillot, C., and Barouki, R. (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.
- Coumoul, X., Diry, M., and Barouki, R. (2002). PXR-dependent induction of human CYP3A4 gene expression by organochlorine pesticides. *Biochem. Pharmacol.* 64, 1513–1519.

- Cranmer, M., Louie, S., Kennedy, R.H., Kern, P.A., and Fonseca, V.A. (2000). Exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) is associated with hyperinsulinemia and insulin resistance. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* *56*, 431–436.
- Cyphert, T.J., Suchanek, A.L., Griffith, B.N., and Salati, L.M. (2013). Starvation actively inhibits splicing of glucose-6-phosphate dehydrogenase mRNA via a bifunctional ESE/ESS element bound by hnRNP K. *Biochim. Biophys. Acta* *1829*, 905–915.
- Desaulniers, D., Cooke, G.M., Leingartner, K., Soumano, K., Cole, J., Yang, J., Wade, M., and Yagminas, A. (2005). Effects of postnatal exposure to a mixture of polychlorinated biphenyls, p,p'-dichlorodiphenyltrichloroethane, and p,p'-dichlorodiphenyldichloroethene in prepubertal and adult female Sprague-Dawley rats. *Int. J. Toxicol.* *24*, 111–127.
- Diani-Moore, S., Ram, P., Li, X., Mondal, P., Youn, D.Y., Sauve, A.A., and Rifkind, A.B. (2010). Identification of the aryl hydrocarbon receptor target gene TiPARP as a mediator of suppression of hepatic gluconeogenesis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and of nicotinamide as a corrective agent for this effect. *J. Biol. Chem.* *285*, 38801–38810.
- Guillouzo, A., Corlu, A., Aninat, C., Glaise, D., Morel, F., and Guguen-Guillouzo, C. (2007). The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem. Biol. Interact.* *168*, 66–73.
- Howard, G.J., Schlezinger, J.J., Hahn, M.E., and Webster, T.F. (2010). Generalized concentration addition predicts joint effects of aryl hydrocarbon receptor agonists with partial agonists and competitive antagonists. *Environ. Health Perspect.* *118*, 666–672.
- Jennen, D.G.J., Magkoufopoulou, C., Ketelslegers, H.B., van Herwijnen, M.H.M., Kleinjans, J.C.S., and van Delft, J.H.M. (2010). Comparison of HepG2 and HepaRG by whole-genome gene expression analysis for the purpose of chemical hazard identification. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* *115*, 66–79.
- Jossé, R., Aninat, C., Glaise, D., Dumont, J., Fessard, V., Morel, F., Poul, J.-M., Guguen-Guillouzo, C., and Guillouzo, A. (2008). Long-term functional stability of human HepaRG hepatocytes and use for chronic toxicity and genotoxicity studies. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* *36*, 1111–1118.
- Kamel, F. (2013). Epidemiology. Paths from pesticides to Parkinson's. *Science* *341*, 722–723.
- Kanebratt, K.P., and Andersson, T.B. (2008). Evaluation of HepaRG cells as an in vitro model for human drug metabolism studies. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* *36*, 1444–1452.
- Klein, S., Mueller, D., Schevchenko, V., and Noor, F. (2014). Long-term maintenance of HepaRG cells in serum-free conditions and application in a repeated dose study. *J. Appl. Toxicol. JAT* *34*, 1078–1086.
- Kortenkamp, A., Faust, M., Scholze, M., and Backhaus, T. (2007). Low-level exposure to multiple chemicals: reason for human health concerns? *Environ. Health Perspect.* *115 Suppl 1*, 106–114.
- Lee, D.-H., Steffes, M.W., Sjödin, A., Jones, R.S., Needham, L.L., and Jacobs, D.R. (2011). Low dose organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls predict obesity, dyslipidemia, and insulin resistance among people free of diabetes. *PloS One* *6*, e15977.
- Lopes Costa, A., Le Bachelier, C., Mathieu, L., Rotig, A., Boneh, A., De Lonlay, P., Tarnopolsky, M.A., Thorburn, D.R., Bastin, J., and Djouadi, F. (2014). Beneficial effects of resveratrol on respiratory chain

defects in patients' fibroblasts involve estrogen receptor and estrogen-related receptor alpha signaling. *Hum. Mol. Genet.* 23, 2106–2119.

Lyche, J.L., Grześ, I.M., Karlsson, C., Nourizadeh-Lillabadi, R., Berg, V., Kristoffersen, A.B., Skåre, J.U., Alestrøm, P., and Ropstad, E. (2013). Parental exposure to natural mixtures of POPs reduced embryo production and altered gene transcription in zebrafish embryos. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 126, 424–434.

Magliano, D.J., Loh, V.H.Y., Harding, J.L., Botton, J., and Shaw, J.E. (2014). Persistent organic pollutants and diabetes: a review of the epidemiological evidence. *Diabetes Metab.* 40, 1–14.

Merhi, M., Demur, C., Racaud-Sultan, C., Bertrand, J., Canlet, C., Estrada, F.B.Y., and Gamet-Payrastre, L. (2010). Gender-linked haematopoietic and metabolic disturbances induced by a pesticide mixture administered at low dose to mice. *Toxicology* 267, 80–90.

Nawaz, A., Razpotnik, A., Rouimi, P., de Sousa, G., Cravedi, J.P., and Rahmani, R. (2014). Cellular impact of combinations of endosulfan, atrazine, and chlorpyrifos on human primary hepatocytes and HepaRG cells after short and chronic exposures. *Cell Biol. Toxicol.* 30, 17–29.

Perobelli, J.E., Martinez, M.F., da Silva Franchi, C.A., Fernandez, C.D.B., de Camargo, J.L.V., and Kempinas, W.D.G. (2010). Decreased sperm motility in rats orally exposed to single or mixed pesticides. *J. Toxicol. Environ. Health A* 73, 991–1002.

Pierre, S., Chevallier, A., Teixeira-Clerc, F., Ambolet-Camoit, A., Bui, L.-C., Bats, A.-S., Fournet, J.-C., Fernandez-Salguero, P., Aggerbeck, M., Lotersztajn, S., et al. (2014). Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of liver fibrosis by dioxin. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 137, 114–124.

Puigserver, P., Rhee, J., Donovan, J., Walkey, C.J., Yoon, J.C., Oriente, F., Kitamura, Y., Altomonte, J., Dong, H., Accili, D., et al. (2003). Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1–PGC-1 α interaction. *Nature* 423, 550–555.

Rogue, A., Lambert, C., Spire, C., Claude, N., and Guillouzo, A. (2012). Interindividual variability in gene expression profiles in human hepatocytes and comparison with HepaRG cells. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 40, 151–158.

Samanez, C.H., Caron, S., Briand, O., Dehondt, H., Duplan, I., Kuipers, F., Hennuyer, N., Clavey, V., and Staels, B. (2012). The human hepatocyte cell lines IHH and HepaRG: models to study glucose, lipid and lipoprotein metabolism. *Arch. Physiol. Biochem.* 118, 102–111.

Savary, C.C., Jossé, R., Bruyère, A., Guillet, F., Robin, M.-A., and Guillouzo, A. (2014). Interactions of endosulfan and methoxychlor involving CYP3A4 and CYP2B6 in human HepaRG cells. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 42, 1235–1240.

Son, H.-K., Kim, S.-A., Kang, J.-H., Chang, Y.-S., Park, S.-K., Lee, S.-K., Jacobs, D.R., and Lee, D.-H. (2010). Strong associations between low-dose organochlorine pesticides and type 2 diabetes in Korea. *Environ. Int.* 36, 410–414.

Stark, R., Guebre-Egziabher, F., Zhao, X., Feriod, C., Dong, J., Alves, T.C., Ioja, S., Pongratz, R.L., Bhanot, S., Roden, M., et al. (2014). A role for mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) in the regulation of hepatic gluconeogenesis. *J. Biol. Chem.* 289, 7257–7263.

Thayer, K.A., Heindel, J.J., Bucher, J.R., and Gallo, M.A. (2012). Role of environmental chemicals in diabetes and obesity: a National Toxicology Program workshop review. *Environ. Health Perspect.* 120, 779–789.

U.S. EPA Environmental Protection Agency. (2007). RED (Re-registration Eligibility Decision) document: endosulfan updated risk assessments, notice of availability, and solicitation of usage information. Federal Register U.S. Environmental Protection Agency; 64624-6; Docket: EPA-HQ-OPP-2002-0262.

U.S. EPA Environmental Protection Agency. (2012). EPA's Reanalysis of Key Issues Related to Dioxin Toxicity and Response to NAS comments, volume 1 (CAS No.1746-01-6) EPA/600/R-10/038F U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

Walsh, C.M., Suchanek, A.L., Cyphert, T.J., Kohan, A.B., Szeszel-Fedorowicz, W., and Salati, L.M. (2013). Serine arginine splicing factor 3 is involved in enhanced splicing of glucose-6-phosphate dehydrogenase RNA in response to nutrients and hormones in liver. *J. Biol. Chem.* 288, 2816–2828.

Wang, Y.-P., Zhou, L.-S., Zhao, Y.-Z., Wang, S.-W., Chen, L.-L., Liu, L.-X., Ling, Z.-Q., Hu, F.-J., Sun, Y.-P., Zhang, J.-Y., et al. (2014). Regulation of G6PD acetylation by SIRT2 and KAT9 modulates NADPH homeostasis and cell survival during oxidative stress. *EMBO J.* 33, 1304–1320.

Wong, P.S.Y., and Matsumura, F. (2006). Serum free BG-1 cell proliferation assay: a sensitive method for determining organochlorine pesticide estrogen receptor activation at the nanomolar range. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 20, 382–394.

Woo, S., Yum, S., Kim, D.-W., and Park, H.-S. (2009). Transcripts level responses in a marine medaka (*Oryzias javanicus*) exposed to organophosphorus pesticide. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol. CBP* 149, 427–432.

Table 1
Primer sequences for RT-qPCR assays

Gene	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
Glucose transporter 2 (Glut2)	CACTTGGCCACTTTTCATCAG	AAGTATCTGGGGCTTTCTG
Glucose-6-phosphatase G6Pc	TTGTGGTTGGGATTCTGG	CTGTGGATGTGGCTGAAAG
Ribosomal proteinL13a (RPL13A)	AAGGTCGTGCGTCTGAAG	GAGTCCGTGGGTCTTGAG
Pyruvate dehydrogenase kinase 2	ATTCTCCACCCATCAAGG	AGCCCATAACCAAAGCCAG
Pyruvate dehydrogenase kinase 4	AAAACCAGCCAAAGGAGC	AACACCAGGAAAATCAGCC
Liver pyruvate kinase	CCTCTGCCTACTGGACATTG	CCGTGGGAGAAGTTGAGTC
Glycogen synthase 2	ATCCCAGGCCTTCTGAGTA	TTCTTCCCATGAGGAACGTG
Glycogen phosphorylase	CGCAGCAGCACTACTACG	AAGCAGGCAGCAAGTCTC
Hexokinase 2	CGCAAGGAGATGGAGAAAAG	AAAGCACAGGGAAGTTGG
Fructose 1,6 bisphosphatase	CTACTGCCCTCTCTTGCC	CCTTCTGCCCTCCTC
Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase	GCTCTGAGGAGGAGAATGG	TGCTCTTGGGTGACGATAAC
Pyruvate carboxylase	GATGGGAGACAAGGTGGAG	GAAGATGATGGGGAAGCC

Table 2

Expression of genes involved in carbohydrate metabolism

mRNA levels were measured by RTqPCR and expressed as fold $\pm$ standard deviation as compared to the corresponding control value (set as 1) (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$), or to the corresponding mixture value (\$, $p < 0.05$, \$\$, $p < 0.01$).

Metabolic pathway	Gene name	No glucose medium with gluconeogenic substrates			11mM glucose “complete Williams’E medium”		
		TCDD	α -endosulfan	mixture	TCDD	α -endosulfan	mixture
Gluconeogenesis	SLC2A2	0.4 $\pm$ 0.16*	0.56 $\pm$ 0.34*	0.27 $\pm$ 0.17*	0.24 $\pm$ 0.06***\$\$	0.53 $\pm$ 0.17***\$\$	0.11 $\pm$ 0.1**
	G6PC	0.43 $\pm$ 0.15***\$\$	0.23 $\pm$ 0.04***\$	0.13 $\pm$ 0.03**	0.19 $\pm$ 0.02***\$\$	0.3 $\pm$ 0.07***\$\$	0.07 $\pm$ 0.04**
	FBP1	1.15 $\pm$ 0.4	1.25 $\pm$ 0.5	1.99 $\pm$ 0.9	0.86 $\pm$ 0.29	0.94 $\pm$ 0.25	0.92 $\pm$ 0.32
	PC	0.9 $\pm$ 0.3	1.17 $\pm$ 0.5	1.11 $\pm$ 0.4	0.92 $\pm$ 0.12	0.90 $\pm$ 0.16	0.95 $\pm$ 0.18
	PCK2	0.49 $\pm$ 0.2*	0.38 $\pm$ 0.2*	0.29 $\pm$ 0.2*	0.5 $\pm$ 0.21*	0.6 $\pm$ 0.41\$	0.3 $\pm$ 0.14*
Glycolysis	HK2	1.94 $\pm$ 0.35**	1.2 $\pm$ 0.34\$\$	1.79 $\pm$ 0.16**	1.74 $\pm$ 0.26*	0.93 $\pm$ 0.15\$	1.44 $\pm$ 0.31*
	PKLR	0.48 $\pm$ 0.18*	0.45 $\pm$ 0.26*	0.29 $\pm$ 0.16*	0.34 $\pm$ 0.2*	0.36 $\pm$ 0.28*	0.22 $\pm$ 0.15*
	PDK 2	0.81 $\pm$ 0.1	0.87 $\pm$ 0.34	0.72 $\pm$ 0.11	0.79 $\pm$ 0.16*	0.81 $\pm$ 0.16*	0.67 $\pm$ 0.15*
	PDK4	1.47 $\pm$ 0.49	0.82 $\pm$ 0.37	1.25 $\pm$ 0.45	1.04 $\pm$ 0.21	0.84 $\pm$ 0.13	0.89 $\pm$ 0.25
Glycogenesis	GYS2	0.66 $\pm$ 0.21*	1.03 $\pm$ 0.13\$	0.75 $\pm$ 0.2*	0.68 $\pm$ 0.28*	0.9 $\pm$ 0.31\$	0.53 $\pm$ 0.15*
	PYGL	0.98 $\pm$ 0.21	1.09 $\pm$ 0.46	1.16 $\pm$ 0.32	1.11 $\pm$ 0.3	0.94 $\pm$ 0.34	1.05 $\pm$ 0.41

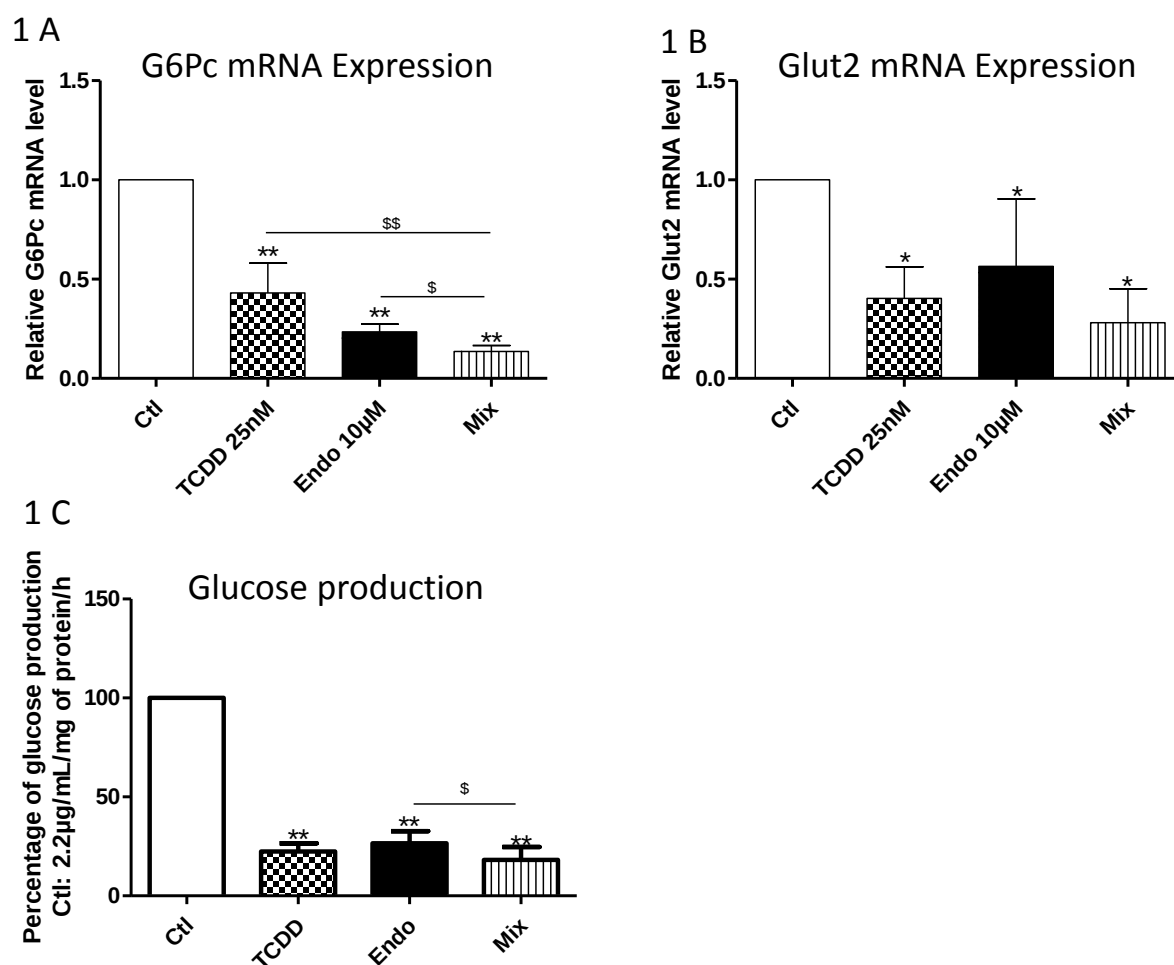


Figure 1. Effect on HepaRG cells of exposure to 25nM TCDD, 10μM α-endosulfan or the mixture under “gluconeogenic” conditions. (A, B). The level of mRNA of G6PC (A) and GLUT2 (B) was measured after 30h of cultivation under “gluconeogenic” conditions in the presence of POPs as described in the Methods. **C.** Quantification of glucose production was performed after 72h of treatment. The values are the means of 4-6 experiments in duplicate +/- the standard deviation. Stars represent the level of significance of the fold-change as compared to the control (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$) \$ represent the level of significance of the fold-change of the mixture as compared to either TCDD or α-endosulfan treatment alone (\$, $p < 0.05$, \$\$, $p < 0.01$). Kruskal-Wallis and a post hoc test were used for the statistical analysis.

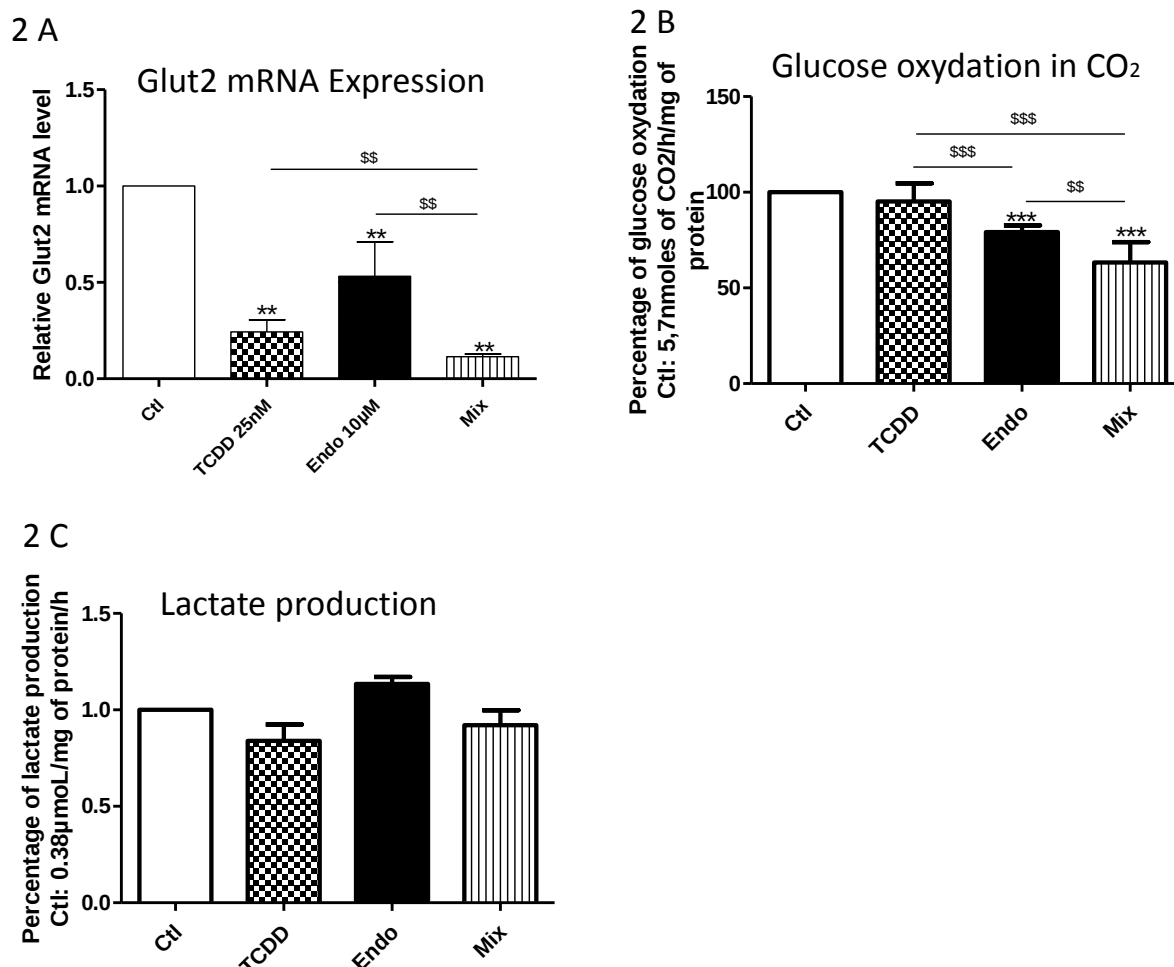


Figure 2. Effect of 25nM TCDD, 10μM α-endosulfan or the mixture on HepaRG cells cultivated under “glycolytic” conditions. **A.** The levels of GLUT2 mRNA were measured after 30h of exposure to POPs under “glycolytic” conditions of culture (complete Williams’E medium). **B.** Quantification of radioactive glucose oxidation into radioactive CO₂ was performed after 72h of POP exposure. **C.** Quantification of lactate production after 72h of POP exposure. The values are the means of 3-6 experiments in duplicate or triplicate +/- the standard deviation. Stars represent the level of significance of the fold-change as compared to the control (**, p<0.01, ***, p<0.001). \$ represent the level of significance of the fold-change of the mixture as compared to either TCDD or α-endosulfan treatment alone (\$\$, p<0.01). Kruskal-Wallis and a post hoc test were used for the statistical analysis.

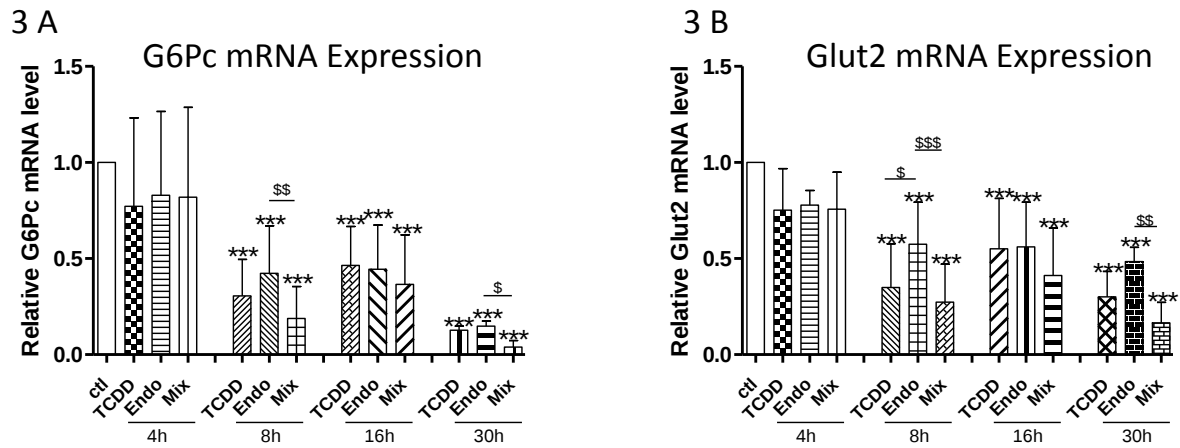


Figure 3. Time course of gene expression following exposure of HepaRG cells to pollutants under “glycolytic” conditions. The amount of G6PC and GLUT2 mRNA was measured 4, 8, 16 and 30h following exposure of cells to 25nM TCDD, 10 μ M α -endosulfan or the mixture in the complete Williams’E medium. The values are the means $\pm$ standard deviation of 4 independent experiments in duplicate. Stars represent the level of significance of the fold-change as compared to the control (***p<0.001). \$ represent the level of significance of the fold-change of the mixture as compared to either TCDD or α -endosulfan treatment alone (\$, p<0.05, \$\$, p<0.01, \$\$\$, p<0.001). Kruskal-Wallis and a post hoc test were used for the statistical analysis.

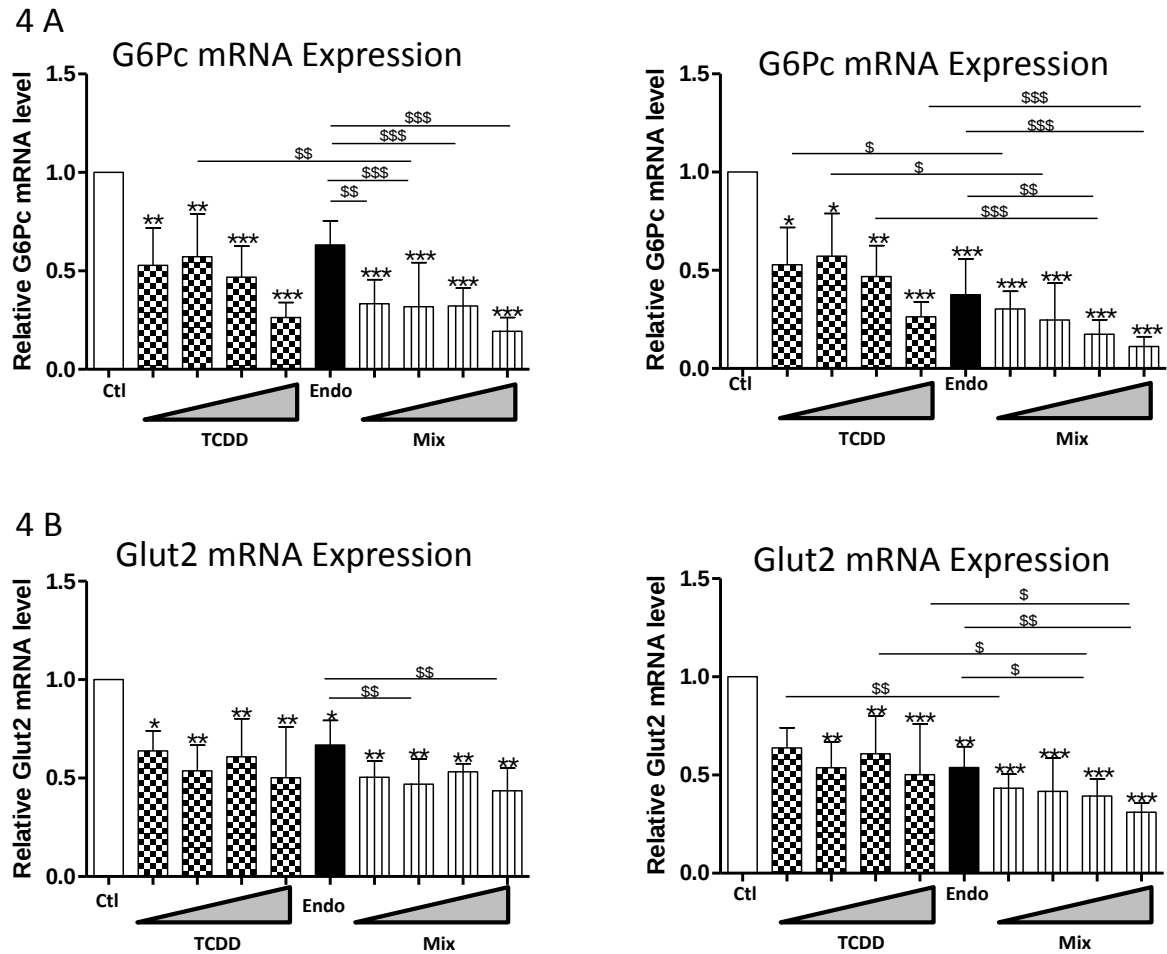


Figure 4. Effect of “semic-chronic” exposure to pollutants of HepaRG cells cultivated under “glycolytic” conditions. The expressions of G6PC (A) and GLUT2 (B) were measured after 8 days of exposure (in the complete Williams’E medium) to TCDD (0.2 to 5nM), 3 μ M (left panel) or 10 μ M (right panel) α -endosulfan and the mixtures. The values are the means $\pm$ standard deviations of 4 to 6 experiments in duplicate. Stars represent the level of significance of the fold-change as compared to the control (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). \$ represent the level of significance of the fold-change of the mixture as compared to either TCDD or α -endosulfan treatment alone (\$, $p < 0.05$, \$\$, $p < 0.01$, \$\$\$, $p < 0.001$) Kruskal-Wallis and a post hoc test were used for the statistical analysis.

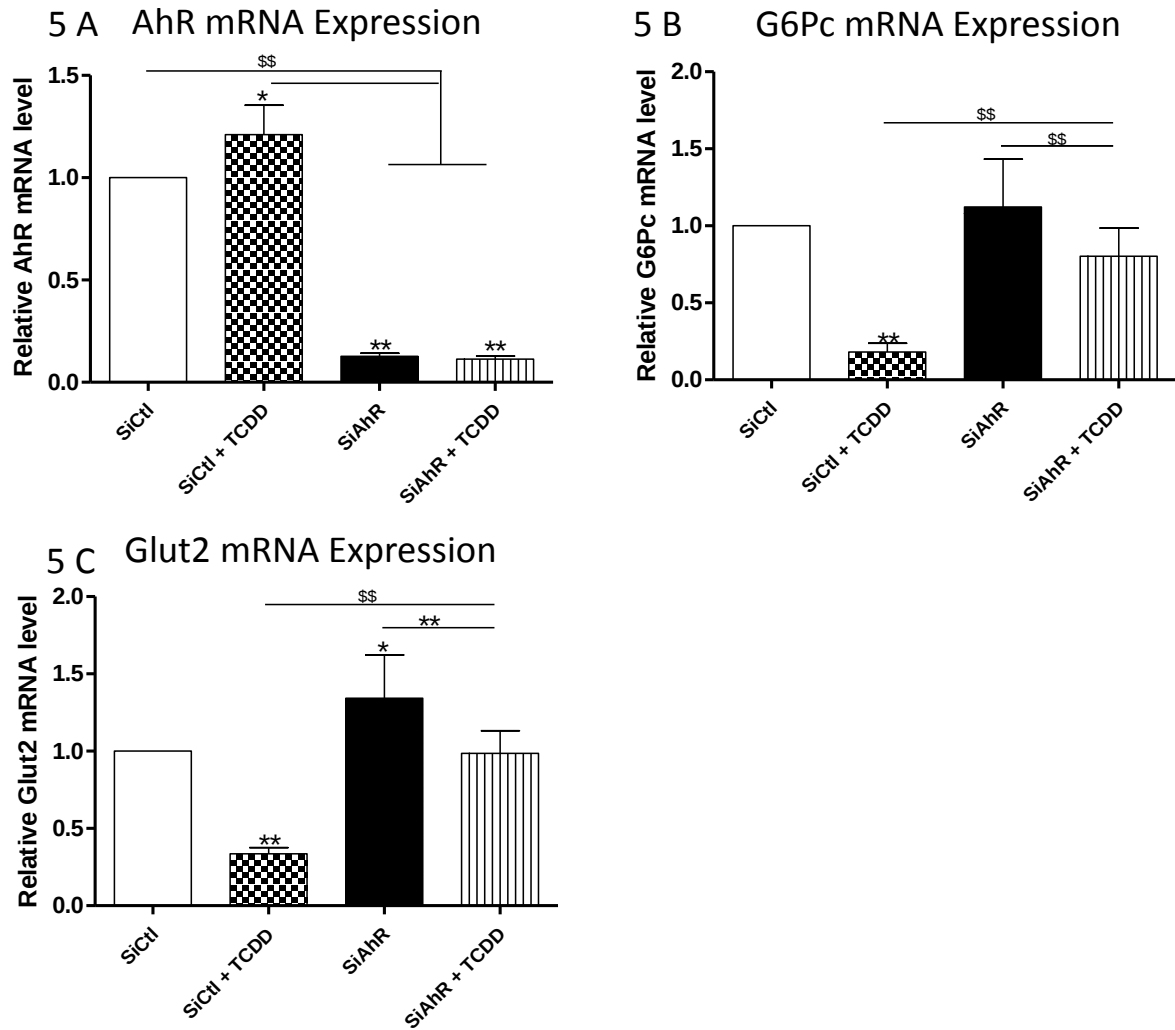


Figure 5. Effect of AhR silencing on gene expression. The expression of AhR (A), G6PC (B) and GLUT2 (C) was measured after transfection with either a control SiRNA or an SiRNA directed against the AhR mRNA. The cells were exposed or not to 25nM TCDD. The values are the means $\pm$ the standard deviation of 3 or 4 experiments in duplicate. Stars represent the level of significance of the fold-change following exposure to TCDD as compared to the control, for both SiRNAs (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$). \$ represents the level of significance of the (\$\$, $p < 0.01$). Kruskal-Wallis and a post hoc test were used for the statistical analysis.

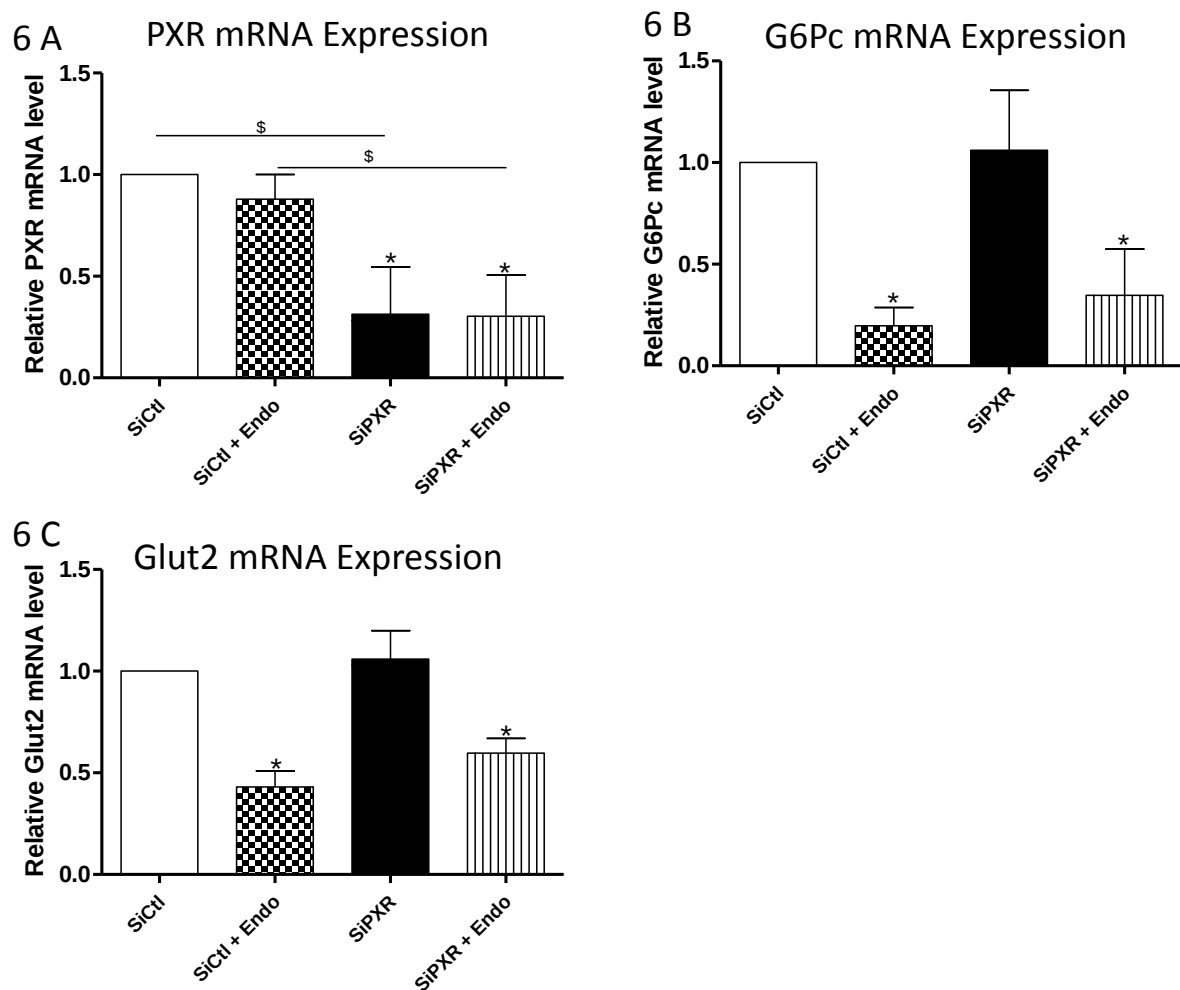


Figure 6. Effect of PXR silencing on gene expression. The expression of AhR (A), G6PC (B) and GLUT2 (C) was measured after transfection with either a control SiRNA or an SiRNA directed against the PXR mRNA. The cells were exposed or not to 10 μ M α -endosulfan. The values are the means $\pm$ standard deviation of 3 experiments in duplicate. Stars represent the level of significance of the fold-change following exposure to α -endosulfan as compared to the control, for both SiRNAs (*, $p < 0.05$). \$ represents the level of significance of the fold-change of the SiAhR with or without exposure to α -endosulfan as compared to the control SiRNA (\$, $p < 0.05$). Kruskal-Wallis and a post hoc test were used for the statistical analysis.

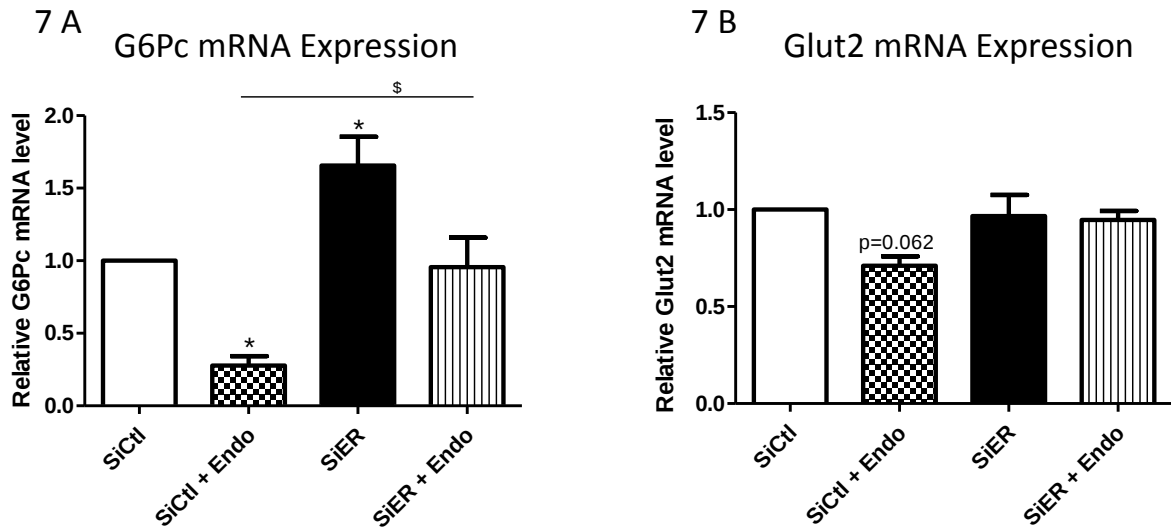


Figure 7. Effect of ER α silencing on gene expression. The expression of G6PC (A) and GLUT2 (B) was measured after transfection with either a control SiRNA or a SiRNA directed against the ER α mRNA. The cells were exposed or not to 10 μ M α -endosulfan. The values are the means $\pm$ standard deviation of 3 experiments in duplicate. Stars represent the level of significance of the fold-change in the condition α -endosulfan as compared to the control one, for both SiRNAs (*, $p < 0.05$). \$ represents the level of of the fold-change of the SiAhR with α -endosulfan as compared to the control SiRNA (\$, $p < 0.05$). Kruskal-Wallis and a post hoc test were used for the statistical analysis.

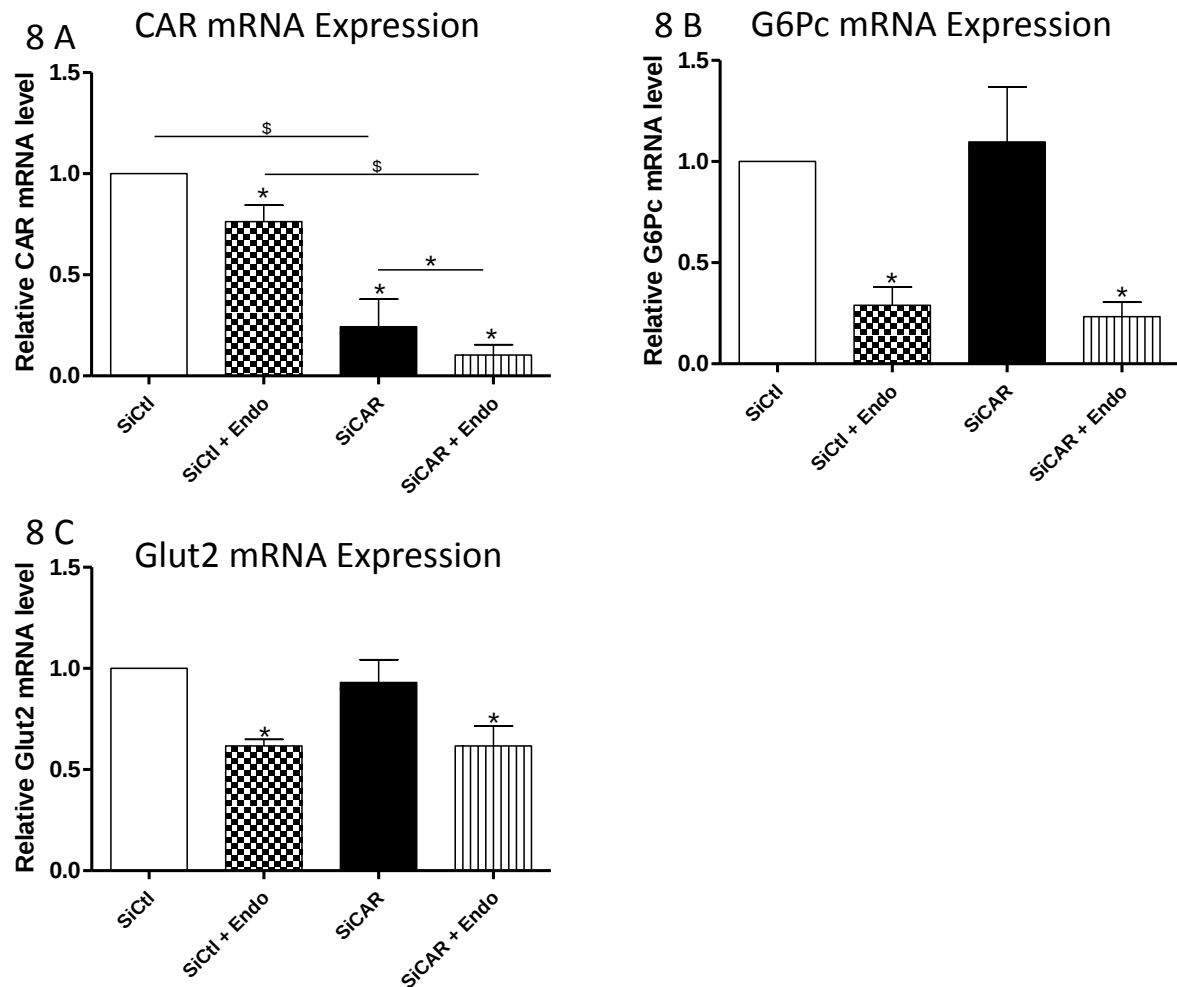


Figure 8. Effect of CAR silencing on gene expression. The expression of CAR (A), G6PC (B) and GLUT2 (C) was measured after transfection with either a control SiRNA or an SiRNA directed against the CAR mRNA. The cells were exposed or not to 10 μ M α -endosulfan. The values are the means $\pm$ standard deviation of 3 experiments in duplicate. Stars represent the level of significance of the fold-change in the condition α -endosulfan as compared to the control one, for both SiRNAs (*, $p < 0.05$). \$ represents the level of the fold-change of the SiAhR with α -endosulfan as compared to control SiRNA (\$, $p < 0.05$). Kruskal-Wallis and a post hoc test were used for the statistical analysis.

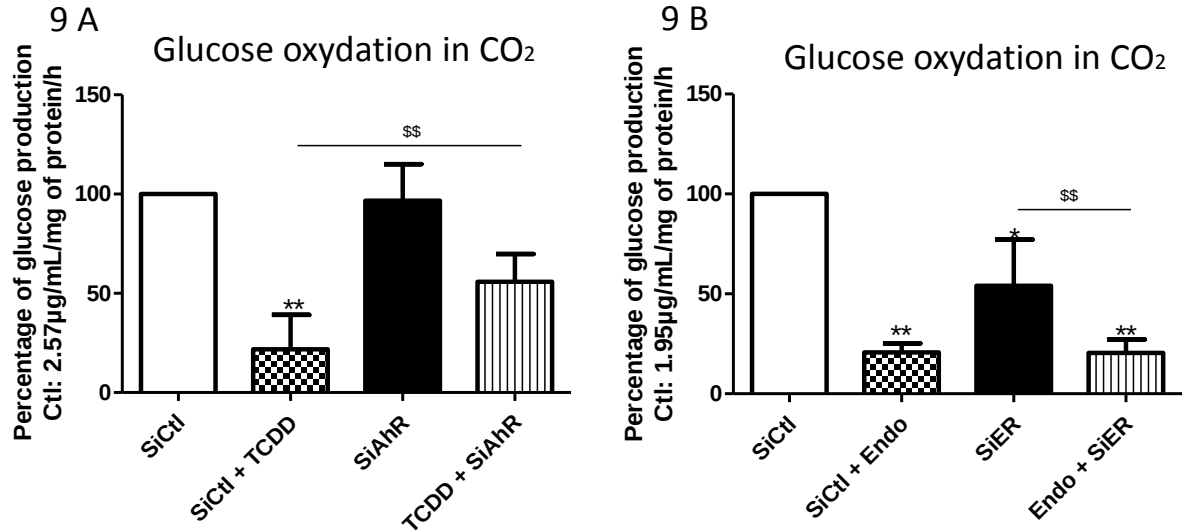


Fig. 9. Effect of AhR and ER silencing on glucose output. Glucose output was measured after AhR silencing in the presence or absence of 25nM TCDD (A), or after ER α silencing in the presence or absence of 10µM α -endosulfan (B). The values are the means $\pm$ standard deviation of 3 to 4 experiments in duplicate. Stars represent the level of significance of the fold-change after TCDD or α -endosulfan treatment as compared to no treatment for the control SiRNA (*, $p < 0.05$ **, $p < 0.01$). \$ represents the level of significance of the fold-change of the TCDD treatment with the siAhR as compared to the control SiRNA (\$\$, $p < 0.01$). Kruskal-Wallis and a post hoc test were used for the statistical analysis.

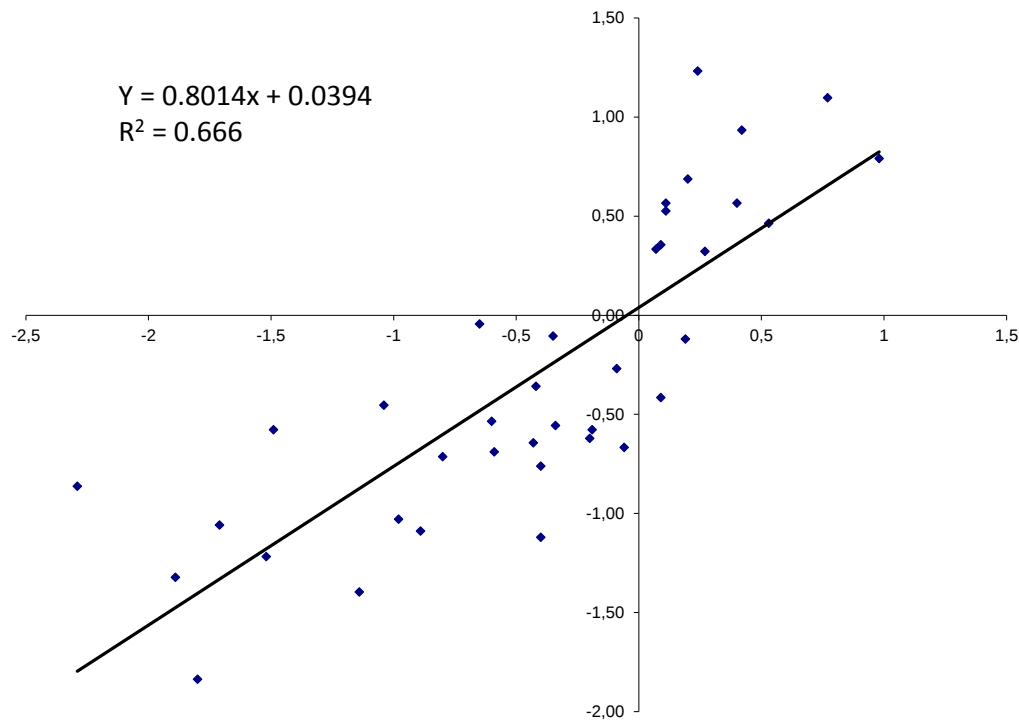


Fig. 10. Comparison of the effects of α -endosulfan and estradiol on the mRNA levels of selected genes in HepaRG cells. We compared the fold-changes after 48h of exposure to estradiol derived from the whole genome transcriptome analysis by Jennen and Colleagues (Jennen et al., 2010) with those obtained after a 30h exposure to 10 μ M α -endosulfan obtained in our whole genome transcriptome analysis (Ambolet-Camoit et al., submitted). The abscissa and the ordinate represent, respectively, the fold-change of mRNA levels after exposure of cells to estradiol or to α -endosulfan.

2.2 résultats complémentaires

2.2.1 La piste des lipides

Au vu des résultats présentés dans le manuscrit n°2, c'est-à-dire une diminution de la production de CO₂ par la glycolyse aérobie sans modification de la quantité de lactate, en présence des polluants, nous avons émis l'hypothèse que les traitements pourraient avoir un effet sur le métabolisme des lipides, en redirigeant les différents substrats énergétiques vers une accumulation de lipides. En effet, il a été montré, dans des hépatocytes primaires humains et de souris que la TCDD entraînait une accumulation de lipides [Forgacs et al., 2013]. Les cellules HepaRG ont été traitées pendant 72h par les polluants, certaines ont reçu, pendant les dernières 48h de traitement du palmitate-BSA, à 100 ou 150μM, comme substrat. Ensuite, les cellules ont été fixées puis incubées avec du Red Oil O pour marquer les lipides neutres. Le protocole est schématisé dans la figure n°19. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure n°20.

Nous observons qu'il y a une augmentation de la quantité du marquage avec l'augmentation de la concentration en Palmitate-BSA. On remarque aussi que seules les cellules de type hépatocytaire sont marquées par le Red Oil O, et sont donc les seules à pouvoir accumuler les gouttelettes lipidiques. Dans les cellules n'ayant pas été traitées par le Palmitate-BSA, les cellules contrôle présentent quelques gouttelettes lipidiques. Les cellules traitées à la TCDD ne présentent plus de marquage au Red Oil O, alors que dans les cellules traitées à l'α endosulfan on observe une augmentation du marquage. Le marquage au Red Oil O des cellules traitées par le mélange semble avoir le même profil que les cellules contrôles. L'incubation des cellules avec 100 ou 150μM de Palmitate-BSA dans les différentes conditions de traitement aux polluants ne modifie pas le profil de stockage des gouttelettes lipidiques induit par les POPs, l'α-endosulfan ayant l'effet le plus marqué.

2.2.2 Résultats préliminaires *in vivo*

En parallèle des expériences *in vitro*, nous avons effectué des expériences *in vivo* chez la souris C57Bl/6J. Des souris mâles et femelles ont reçu une injection par semaine, pendant six semaines de TCDD 0.1, 1, 10 ou 25 μg kg⁻¹ ou de l'huile de maïs, le véhicule utilisé. Nous avons analysé les effets des traitements sur l'expression des ARNm de la glucose-6-phosphatase (G6pc) et du transporteur de glucose Glut 2 (Slc2a2).

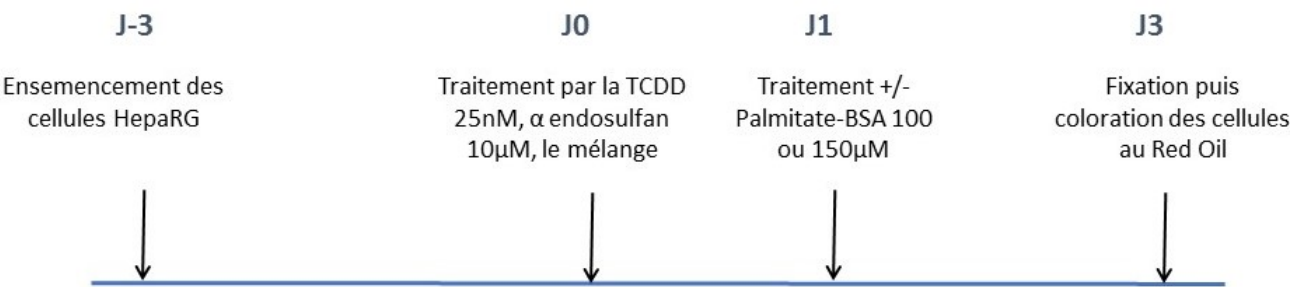


FIGURE 19 – Schéma expérimental de la cinétique des expériences de marquage au Red Oil. Trois jours après avoir été ensemencées, les cellules sont traitées par la TCDD 25nM, l' α endosulfan 10 μ M ou le mélange. Vingt-quatre heures le milieu est changé, et les cellules sont incubées en présence des traitements avec le milieu normal, le milieu contenant 100 μ M ou 150 μ M de Palmitate-BSA pendant 48h. Ensuite, les cellules ont été fixées et marquées au Red Oil.

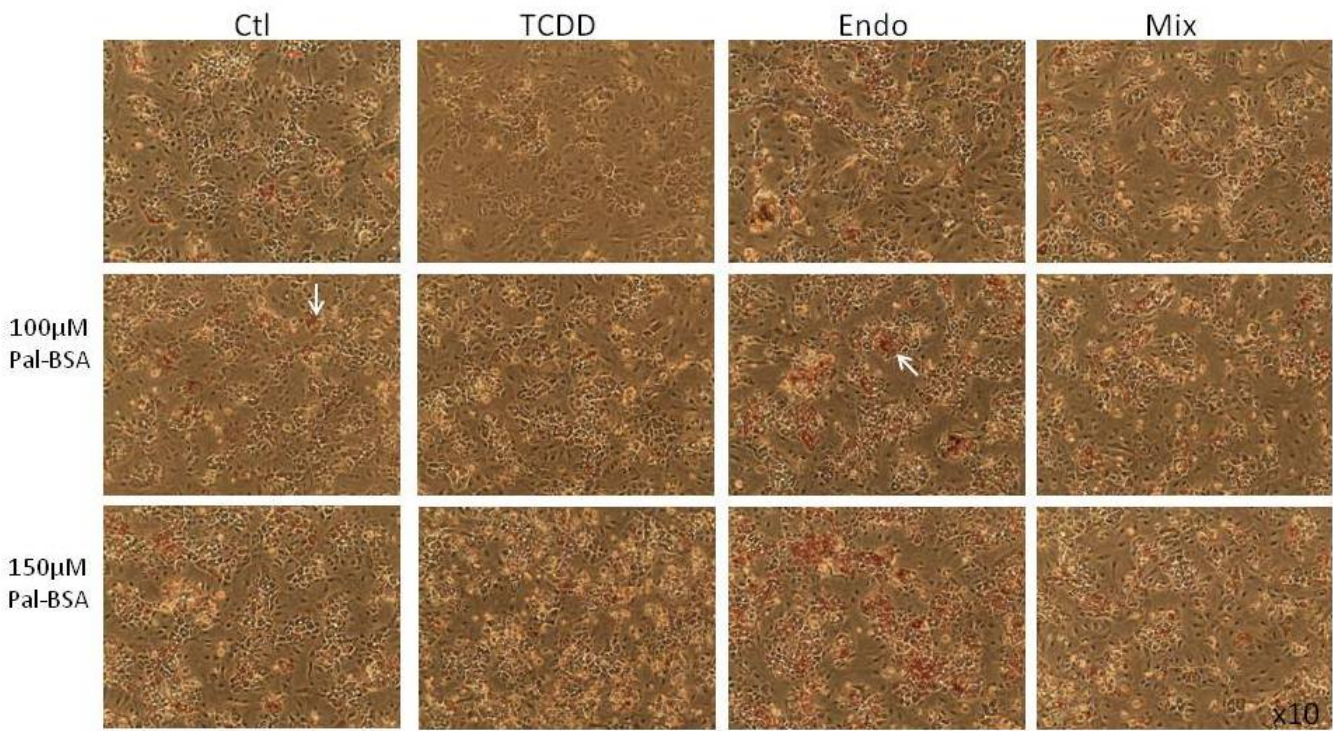


FIGURE 20 – Photographie des cellules HepaRG traitées par les polluants, en présence ou non de palmitate-BSA 100 ou 150 μ M, puis marquées au Red oil O. Les cellules ont été traitées par la TCDD 25nM, l' α endosulfan 10 μ M ou le mélange en présence ou non de palmitate-BSA 100 ou 150 μ M, puis les lipides neutres ont été marqués par le Red oil O.

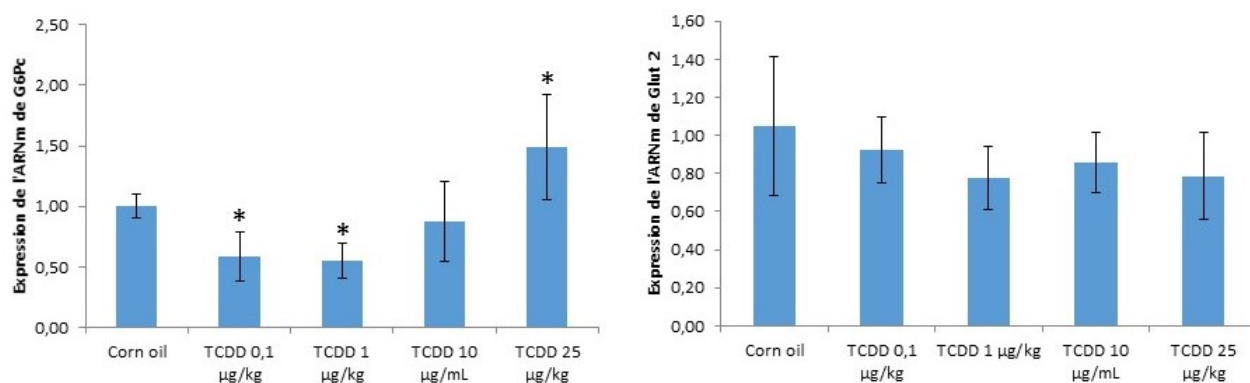


FIGURE 21 – Étude des effets d’une injection par semaine de 0.1, 1, 10 et 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de TCDD pendant six semaines chez les souris mâles.

Des souris mâles C57Bl/6J (huile de maïs, $n=3$; TCDD 0.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$, $n=5$; TCDD 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$, $n=5$; TCDD 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, $n=4$; TCDD 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$, $n=3$) ont reçu une injection par semaine pendant six semaines de 0.1, 1, 10 et 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de TCDD. Puis les ARNm des foies de souris ont été récupérés, afin d’analyser l’effet des traitements sur l’expression des ARNm de G6pc et de Slc2a2.

Chez les souris mâles (figure n°21), pour l’ARNm de G6pc nous observons une courbe U, en effet, les deux doses les plus faibles, 0.1 et 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de TCDD, entraînent une diminution significative de l’expression de l’ARNm de G6pc. Le traitement par 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de TCDD, n’a pas d’effet, alors que celui de 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ entraîne une augmentation de l’expression de l’ARNm. Chez ces souris, l’expression de l’ARNm de Slc2a2 n’est pas significativement modifiée, mais il y a une tendance à la diminution avec les doses les plus élevées.

Chez les souris femelles (figure n°22), nous observons également une courbe en U de l’expression de l’ARNm de G6pc. Comme chez les mâles, les deux doses les plus faibles entraînent une diminution de l’expression de cet ARNm, la dose à 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de TCDD entraîne une légère augmentation statistiquement significative, alors que la dose la plus élevée ne modifie pas l’expression de l’ARNm de G6pc. Contrairement aux résultats obtenus chez les mâles, on observe une légère augmentation de l’ARNm de Slc2a2 par la dose de TCDD la plus faible, 0.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$, puis on observe une diminution dose dépendante qui est statistiquement significative aux doses 10 et 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

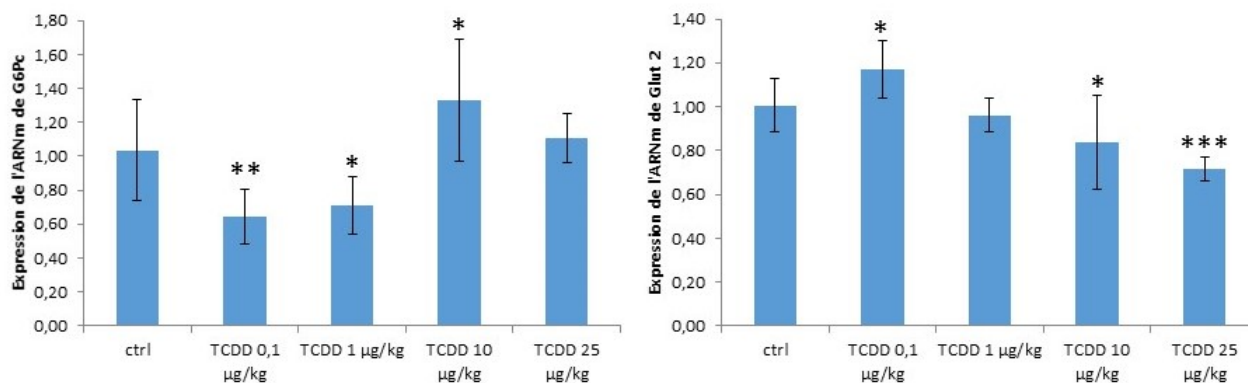


FIGURE 22 – Étude des effets d’une injection par semaine de 0.1, 1, 10 et 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de TCDD pendant six semaines chez les souris femelles.

Des souris femelles C57Bl/6J (Huile de maïs, $n=7$; TCDD 0.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$, $n=7$; TCDD 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$, $n=5$; TCDD 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, $n=7$; TCDD 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$, $n=6$) ont reçu une injection par semaine pendant six semaines de 0.1, 1, 10 et 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de TCDD. Puis les ARNm des foies de souris ont été récupérés, afin d’analyser l’effet des traitements sur l’expression des ARNm de G6pc et de Slc2a2.

2.3 Conclusion

Le foie est non seulement le principal organe impliqué dans la détoxification de l’organisme, mais aussi le seul capable de réguler la glycémie. Dans cette étude, nous avons analysé les effets d’un mélange de POPs composé d’une dioxine, la TCDD, et d’un pesticide organochloré, l’*alpha* endosulfan. Ces xenobiotiques utilisent des voies différentes, la TCDD est connue pour activer la voie du AhR, et l’*alpha* endosulfan la voie du ER et/ou du PXR. Les effets de l’activation de ces voies ont été étudiés sur le métabolisme glucidique dans la lignée hépatique humaine HepaRG, dont les caractéristiques se rapprochent de celles des cellules hépatiques humaines. Une étude du transcriptome avait montré des diminutions importantes, par le mélange des polluants, de certains ARNm impliqués dans le métabolisme glucidique, comme la G6Pc et le transporteur GLUT 2 (SLC2A2) (table 5 de l’article n°1). La G6Pc étant la dernière enzyme de la voie de la néoglucogenèse, les effets, en condition néoglucogénique, des polluants en mélange par rapport aux polluants seuls sur les ARNm ont été étudiés par RT-qPCR (table 2 et figure 1 de l’article n°2). Après 30h de traitement, la quantité d’ARNm de G6Pc est diminuée de 90% en présence du mélange, alors qu’en présence de TCDD elle diminue de 55%, et de 75% en présence d’*alpha* endosulfan (figure 1A de l’article n°2). L’ARNm de SLC2A2, diminue de 70% avec le mélange et de 50 à 60% avec les polluants seuls (figure 1B de l’article n°2). Nous avons ensuite étudié

d'autres enzymes importantes dans la voie de la néoglucogenèse, de la glycolyse et du glycogène (table 2 l'article n°2). L'expression de l'ARNm de la PEPCK mitochondriale (PCK2) est fortement diminuée par les différents traitements, alors que l'expression de l'ARNm de la PEPCK cytosolique (PCK1) n'est diminuée qu'en présence de TCDD seule ou du mélange (résultat non présenté). Dans la voie de la glycolyse, l'expression de l'ARNm de la pyruvate kinase est diminuée d'environ 50% par les polluants seuls, et de 70% par le mélange. L'ARNm de l'hexokinase 2 est le seul à être augmenté de 80% en présence de TCDD seule ou du mélange. En condition néoglucogénique, cette enzyme de la glycolyse devrait être moins exprimée. Une augmentation de l'hexokinase 2 a récemment été décrite comme marqueur de carcinome hépatocellulaire. En effet, son augmentation est liée à un mauvais pronostic vital [Gong et al., 2011]. Le résultat obtenu dans la lignée HepaRG pourrait être expliqué par l'origine des cellules qui proviennent d'un hépatocarcinome avec une régulation différente de celle du foie normal. Enfin, l'expression de l'ARNm de la glycogène synthase, impliquée dans la synthèse du glycogène, est diminuée en présence de TCDD seule ou du mélange, alors que celle de la glycogène phosphorylase, impliquée dans la dégradation, n'est pas modifiée par les traitements.

La diminution des ARNm impliqués dans la voie de la néoglucogenèse entraîne la diminution du flux néoglucogénique. En effet, après 72h de traitement, la production de glucose, en condition néoglucogénique, est très fortement diminuée de 70 à 80% quelles que soient les conditions de traitement par les polluants (figure 1C). Si on observe une différence significative pour les conditions α -endosulfan/mélange, l'absence de différence pour les conditions TCDD/mélange pourrait s'expliquer par des raisons techniques, les cellules HepaRG produisent peu de glucose et les conditions de dosage étaient dans la limite basse de la gamme étalon du kit utilisé et donc à la limite de la sensibilité. Dans ces conditions, mesurer des différences statistiquement significatives entre des fortes diminutions est presque impossible.

Etant donné que nous avons observé des diminutions de l'expression des ARNm impliqués dans la voie de la glycolyse, nous avons effectué les mêmes expériences en condition glycolytique. Les mêmes modifications qu'en condition néoglucogénique ont été observées pour tous les ARNm étudiés (table 2). Les mêmes ARNm ont leurs expressions diminuées, et notamment l'ARNm du GLUT 2 qui diminue cette fois plus fortement en présence du mélange (90%) par rapport aux polluants seuls (75% par la TCDD, 50% par l' α -endosulfan) (figure 2A). L'ARNm de l'hexokinase 2 est toujours augmenté seulement en présence de TCDD seule ou du mélange. La diminution de l'ARNm de la PEPCK cytosolique, en présence de TCDD seule ou du

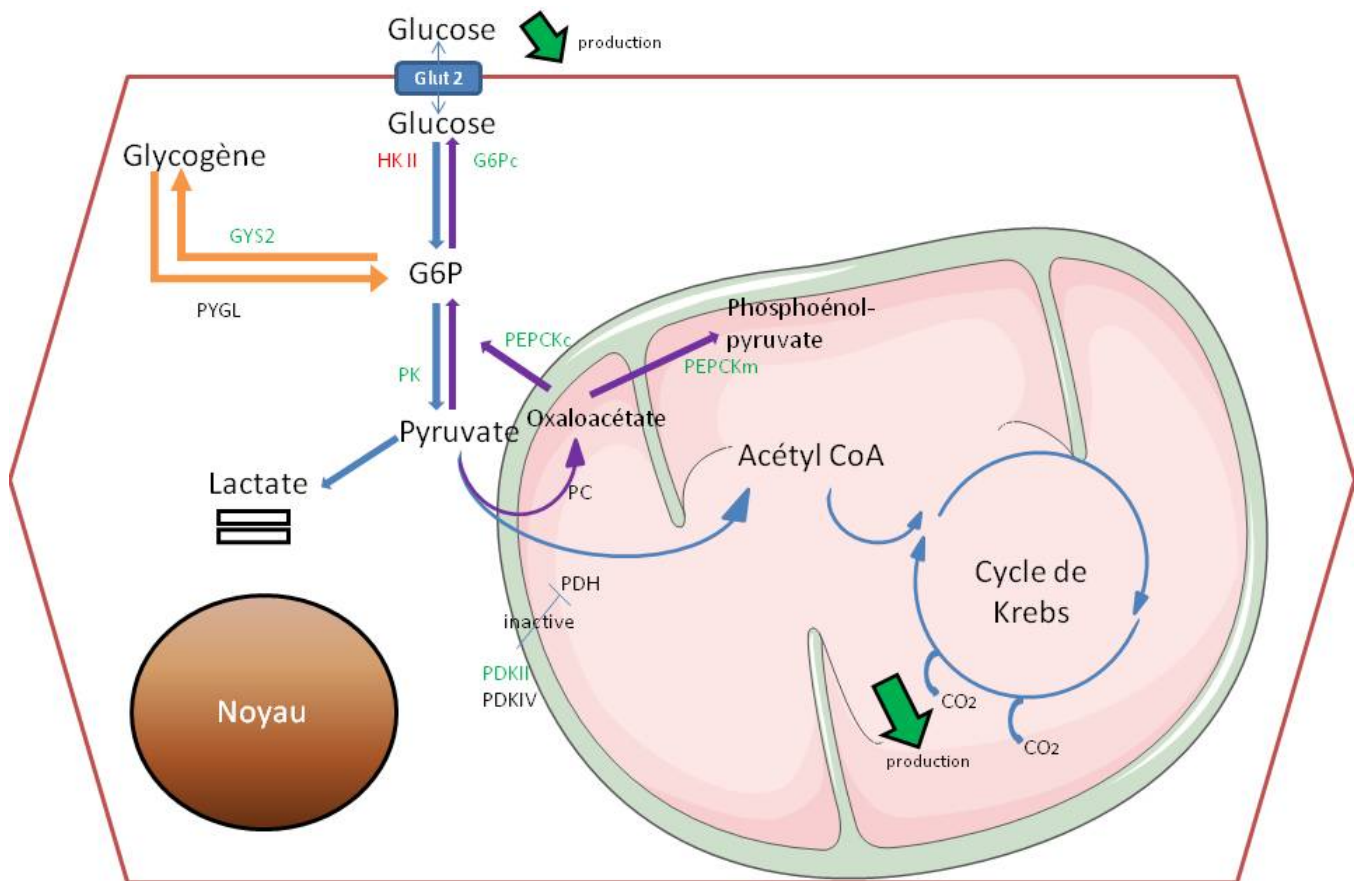
mélange, a également été retrouvée au niveau protéine par western blot.

Comme pour la condition néoglucogénique, nous avons étudié si les modifications d'expression des ARNm en condition glycolytique allaient perturber les flux glycolytiques des cellules HepaRG. Nous avons mesuré la production de lactate en présence de glucose, qui correspond à la glycolyse anaérobie, et nous n'avons pas observé de modification par les différents traitements (figure 2C). La glycolyse aérobie, composée de la glycolyse, transformant le glucose en pyruvate, puis du pyruvate transformé en acétyl CoA et utilisé par le cycle de Krebs, a été évaluée en mesure l'oxydation du glucose en CO₂. La TCDD seule ne modifie pas l'oxydation du glucose en CO₂, alors que l' α -endosulfan la diminue de 20%. Le mélange entraîne une diminution significativement différente de presque 40% de l'oxydation du glucose en CO₂, par rapport aux polluants seuls (figure 2B).

Les modifications de l'expression des ARNm dues à l'exposition aux polluants sont plus importantes que celles qui peuvent être induites par le contexte physiologique nutritionnel des cellules (culture en absence et en présence de glucose). En effet, en condition néoglucogénique, les cellules augmentent l'expression des enzymes du métabolisme néoglucogénique et diminuent celles impliquées dans le métabolisme glycolytique, et inversement en condition glycolytique. Or, nous retrouvons les mêmes modifications d'expression d'ARNm quelles que soient les conditions de culture. Ces modifications se retrouvent au niveau des flux métaboliques et ont donc un réel impact cellulaire. Ces résultats permettent de dire que les modifications de l'expression des gènes, induites par ces polluants, sont indépendantes de l'état "nutritionnel" de nos cellules (figure n°23).

L'étude cinétique a montré que l'expression des ARNm de la G6PC et de SLC2A2 diminuait fortement après 8 heures de traitement (figure 3A et 3B). Cette diminution "rapide" est en faveur d'un effet direct de nos polluants sans besoin de synthèse protéique *de novo*. Cela pourrait être vérifié en faisant les mêmes expériences en présence de cycloheximide, afin de bloquer la synthèse protéique ; cependant la cycloheximide a souvent des effets propres qui gênent l'interprétation des résultats. ces effets "rapides" pourraient être soit des effets transcriptionnels directs soit la modification (phosphorylation, dégradation...) de protéines déjà présentes impliquées dans la transcription des gènes. L'hypothèse de l'implication du facteur transcriptionnel PGC1 α , qui régule la transcription de la G6Pc et de la PEPCKc dans des modèles animaux après traitement à la TCDD [Diani-Moore et al., 2010], devra être testée.

Les voies de signalisation utilisées par les polluants ont été étudiées par ARN interférence.



Voie du glycogène, Glycolyse, Néoglucogenèse

Regulation de l'expression des ARNm par le mélange: Diminution, Augmentation, Stationnaire

FIGURE 23 – Schéma des différentes modifications induites par le mélange sur le métabolisme. Les traitements par le mélange entraînent une diminution de l'expression des ARNm impliqués dans les différentes voies métaboliques : GLUT2, GYS, PK, PDKII, PEPCkM, PEPCkC et de G6Pc. Seul l'expression de l'ARNm de HK II est augmentée. De plus l'oxydation du glucose en CO₂ et la production de glucose sont diminuées.

Comme cela est décrit dans la littérature, nous avons montré que la TCDD utilise la voie classique du AhR. En effet, en présence de SiARN dirigés contre l'ARNm du AhR, nous perdons la diminution de l'expression des ARNm de G6PC et de SLC2A2 (figure 5B et 5C), mais aussi la diminution de la production de glucose, qui sont provoquées par la TCDD (figure 9A). Dans la littérature, plusieurs voies de signalisation ont été décrites pour l' α -endosulfan. Les voies possibles sont la voie du PXR et de ER α . La technique d'ARN interférence nous a permis d'écarter le rôle de la voie du PXR et nous avons aussi montré que le xénosenseur CAR (Constitutive Androstane Receptor) n'avait pas de rôle dans la régulation par le pesticide (figure 6 et 8). L'utilisation du SiARN dirigé contre l'ARNm de ER α entraîne une perte de l'effet de l' α -endosulfan sur l'expression de l'ARNm de Glut 2 (figure 7B). Pour l'ARNm de G6PC, les résultats sont plus difficiles à interpréter. En effet, en absence de polluant, le siER α entraîne une augmentation de 65% de la quantité d'ARNm de G6PC. En présence du pesticide et du siER α , on observe alors une diminution de 45% de l'ARNm de G6PC alors que nous avons une diminution de 75% en présence du siARN contrôle (figure 7A). L'effet de l' α -endosulfan est donc diminué mais pas complètement aboli. Nous avons ensuite mesuré l'effet du pesticide en présence du SiER α sur la production de glucose. De nouveau, le résultat obtenu est difficile à interpréter. En effet, le SiER α seul diminue de 50% la production de glucose par rapport aux cellules transfectées par un SiARN contrôle, en l'absence de traitement. Avec le SiARN contrôle, la production de glucose induite par l' α -endosulfan est diminuée de 80% par rapport aux cellules qui n'ont pas été traitées. En présence du SiER α , la diminution entraînée par l' α -endosulfan est de 80% par rapport aux cellules non traitées, et donc moins importante qu'avec le SiARN contrôle (figure 9B). Cependant, la variation de la base est gênante pour une interprétation sans ambiguïté même si ce résultat suggère un rôle au moins partiel du ER α .

La lignée cellulaire HepaRG a l'avantage de conserver ses propriétés de différenciation et une expression stable de nombreux gènes pendant 4 semaines [Jossé et al., 2008], ce qui nous a permis d'effectuer des expériences sur des temps longs et, ainsi, essayer de se rapprocher de l'exposition chronique de l'Homme à ces POPs. Le temps de traitement est passé de 30 heures à 8 jours pour l'étude de l'expression des ARNm. L' α -endosulfan a été utilisé à 3 et 10 μ M, et la TCDD à 0.2, 0.5, 1 et 5 nM. Les doses les plus faibles de chaque polluant ont entraîné des diminutions des ARNm de G6PC et de SLC2A2. Nous observons un effet significativement plus élevé du mélange par rapport aux polluants seuls pour certaines doses. Pour d'autres mélanges, nous avons surtout un effet TCDD (figure 4).

Un des inconvénients de la lignée cellulaire utilisée est le fait qu'elle se compose de deux types cellulaires différents : les cellules "hepatocyte like" et "biliary like". Étant donné que nous étudions des enzymes et des flux métaboliques spécifiques des cellules hépatiques, il est peu probable que nos traitements aient eu un effet sur les cellules de type biliaire pour les cibles analysées. Toutes les expériences ont été réalisées sur les cellules totales, contenant donc les deux types cellulaires. il est donc tout à fait possible que nos résultats soient minorés par cette double population, et que les effets de nos polluants soient beaucoup plus importants sur les cellules hépatiques.

De plus, notre modèle cellulaire est certes l'un des plus proche de l'homme pour les cellules hépatiques, mais les modèles cellulaires *in vitro* ne pourront jamais remplacer un organisme entier, avec toutes les interactions (hormonales ou autres) possibles au sein d'un tissu et entre les différents tissus qui le composent. Nous avons donc effectué des expériences *in vivo* préliminaires dans lesquelles des souris mâles et femelles ont reçu une injection par semaine pendant six semaines de 0.1, 1, 10 ou 25 μ M de TCDD. Nous avons étudié les effets de cette exposition sur l'expression de l'ARNm de G6pc et de Slc2a2 chez ces souris. L'expression de ces ARNm est différente suivant le sexe ; en effet, les femelles semblent plus sensibles à la TCDD. Cette différence est peut-être due au fait que les mâles éliminent plus rapidement la TCDD grâce à la sécrétion de la Major Urinary Protein (MUP) impliquée dans la libération des phéromones chez le mâles [Sharrow et al., 2002]. La TCDD va se lier à ces MUPs et sera donc éliminée plus rapidement de l'organisme. une autre hypothèse est que le "crosstalk" entre le ER et le AhR, décrit pour certains gènes, influence l'expression des gènes testés.

Chapitre 3

Etude n°3 : Nouveau rôle du AhR et de l'ARNT dans la régulation des Alcool Déshydrogénases

3.1 Polluants organiques persistants et métabolisme de l'alcool

L'alcool éthylique est un des xénobiotiques les plus courants. Il provient de la fermentation des végétaux. Comme la grande majorité des xénobiotiques, il est dégradé dans le foie, entraînant une augmentation du rapport $NADH, H^+ / NAD^+$. Cette augmentation va perturber les autres voies métaboliques en équilibre avec ces co-enzymes.

3.1.1 Métabolisme de l'alcool

L'alcool, désignant tout composé contenant une fonction alcool, est métabolisé par le foie. Dans le foie, l'alcool éthylique ou éthanol (que nous désignerons par alcool dans la suite de ce chapitre), peut être oxydé en acétaldéhyde par deux voies différentes majoritaires :

- par les alcool deshydrogénases (ADHs), en utilisant le NAD^+ comme co-enzyme. C'est la voie la plus utilisée, elle est située dans le cytoplasme. Tous les gènes ADH sont situés sur le chromosome 4, seul l'ADH7 n'est pas exprimée dans le foie (figure n°24).
- par le cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) dans le réticulum endoplasmique en utilisant le

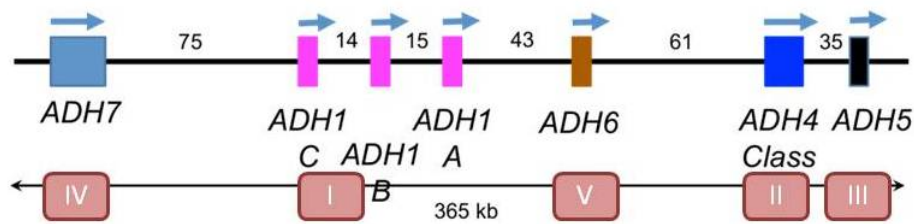


FIGURE 24 – Schéma du la position des ADHs sur le chromosome 4.

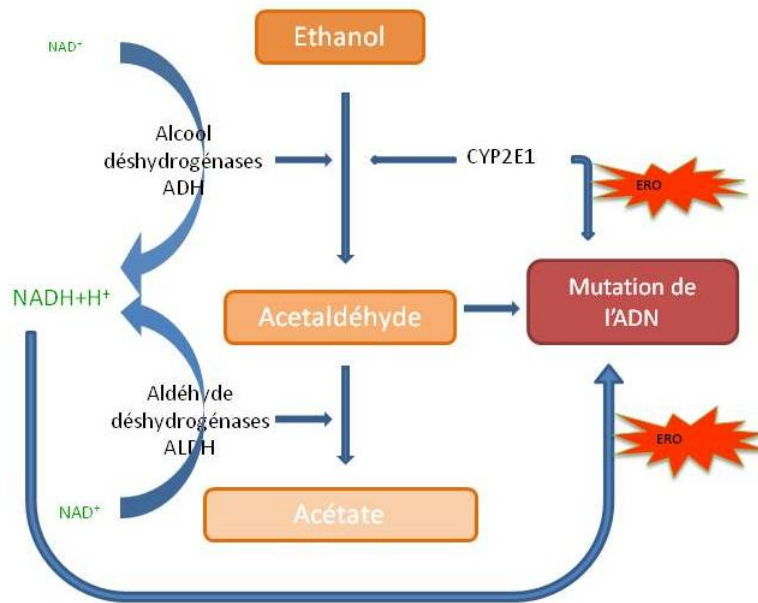


FIGURE 25 – Schéma du métabolisme de l'alcool.

L'éthanol sera métabolisé soit par les ADHs soit par le CYP2E1 en acétaldéhyde. Ce dernier sera transformé en acétate par les ALDHs. Les deux réactions utilisent du NAD^+ et entraînent la formation de $NADH, H^+$.

$NADPH$ pour co-enzyme.

Il existe une voie, minoritaire dans le foie, qui oxyde l'éthanol par la catalase.

Ensuite, l'acétaldéhyde est oxydé en acétate grâce aux aldéhyde déshydrogénases (ALDH), qui ont une localisation cytosolique ou mitochondriale. Les ADHs et les ALDHs sont NAD^+ dépendantes, et entraînent la production de $NADH, H^+$ (figure n°25). L'acétate thiokinase transformera l'acétate en acétyl CoA, qui sera dirigé vers le cycle de Krebs.

Le métabolisme oxydatif de l'éthanol est un facteur majeur de l'apparition de maladies alcooliques du foie. Au cours du métabolisme, l'éthanol est à l'origine de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), d'acétaldéhyde et modifie le rapport $NADH, H^+/NAD^+$ qui va perturber de nombreuses voies métaboliques.

Une consommation excessive d'alcool, en augmentant le rapport $NADH, H^+/NAD^+$, va perturber de nombreuses voies métaboliques, dont certaines ont été décrites précédemment. Cela entraînera des altérations biochimiques et métaboliques du foie, caractérisées par le développement d'une fibrose puis d'une stéatose, et pouvant aller jusqu'à l'hépatite alcoolique et la cirrhose. Une consommation chronique d'éthanol va donc entraîner une production en excès d'acétyl CoA.

3.1.2 Les pathologies hépatiques

Lors d'une consommation d'alcool, le foie est le premier organe qui le prend en charge pour l'éliminer, 25% de l'alcool ingéré est éliminé par le premier passage hépatique. En cas de consommation chronique, on observe l'apparition des pathologies citées précédemment dont les mécanismes de développement sont multiples.

L'acétyl CoA produit en excès sera transformé en AG et en TG afin d'être stocké. Or ces lipides ne pourront pas sortir du foie ; en effet l'alcool va perturber la sécrétion des lipoprotéines nécessaires à l'export des lipides. Les AG et TG formés seront donc stockés dans le foie, ce qui va entraîner une stéatose. A ce stade, l'arrêt de la consommation d'alcool permet de retrouver un foie normal.

L'augmentation du rapport $NADH, H^+/NAD^+$ entraîne l'inhibition des réactions dépendantes du NAD^+ , un ralentissement de la β oxydation, du cycle du Krebs et de la néoglucogenèse et une accélération de la lipogenèse et de la synthèse du cholestérol.

Si la consommation d'alcool se poursuit, une réaction immune va se mettre en place (hépatite), entraînant la synthèse de cytokines qui vont activer les cellules stellaires. Les cellules stellaires activées vont se transformer en fibroblastes qui synthétisent des protéines de la matrice extra-cellulaire, dont le collagène. C'est le stade de la fibrose hépatique. Ce processus va continuer et aboutir à la nécrose des cellules hépatiques altérant le foie et entraînant une insuffisance fonctionnelle hépatique. Une hypertension veineuse portale se met alors en place et s'étend dans tout le système porte. A ce stade, le foie est atteint de cirrhose pathologique, et son état est alors irréversible.

Une consommation importante d'alcool augmente aussi la quantité de CYP2E1, par stabilisation de la protéine, afin de le métaboliser. L'activité du CYP2E1 va générer une production d'ERO (espèce réactive de l'oxygène) qui va entraîner l'activation de jun kinase (JNK).

Les EROs activés provoquent un stress oxydant, mais aussi une diminution de l'autophagie et une augmentation de l'accumulation des lipides, comme le suggère Yang et son équipe [Yang et al., 2012]. Ces régulations favoriseraient également la formation d'une stéatose.

3.1.3 Effet des agonistes du AhR sur le métabolisme de l'alcool

A notre connaissance, il existe peu d'études portant sur l'effet d'agonistes du AhR sur l'expression des enzymes du métabolisme de l'alcool dans la littérature. L'étude de Goasduff et al. montre une diminution de l'ARNm et de la protéine du CYP2E1 en présence de 3-méthylcholanthrène seul ou en présence d'éthanol [Goasduff et al., 1995] ou de TCDD [Morel et al., 2000]. Cependant, diverses études transcriptomiques ont montré une régulation de l'expression des ADHs et des ALDHs par la TCDD dans différents modèles [Jennen et al., 2010] [Forgacs et al., 2013].

3.2 Etude

3.2.1 Introduction

L'analyse du transcriptome, décrite dans l'étude n°1, a montré une diminution de certaines enzymes impliquées dans le métabolisme de l'alcool en présence de TCDD 25nM. En effet, l'expression des ARNm des ADH1, 4 et 6 ainsi que du CYP2E1 sont diminuées de 50 à 70% (tableau 6 de l'article n°1). Les ADHs, qui métabolisent les alcools en aldéhydes en réduisant du NAD^+ en $NADH, H^+$, sont différemment régulées suivant l'isoforme ou le tissu. Les régulations de ces ADHs sont encore mal connues bien que ces enzymes soient ubiquitaires. Dans cette étude, nous avons voulu déterminer les mécanismes impliqués dans la régulation des ADHs par les ligands du AhR. Nous avons mesuré la cinétique d'inhibition des ARNm des ADHs par la TCDD, ainsi que la courbe dose réponse en utilisant des concentrations de 0.01 à 25nM et un traitement de 30h ou huit jours. Les diminutions d'expression des ARNm de différentes ADHs par la TCDD ont été vérifiées au niveau protéique par western blot.

Pour savoir si la TCDD avait un effet transcriptionnel ou post-transcriptionnel sur la régulation des ADHs, nous avons effectué des expériences en utilisant du DRB (inhibiteur de l'ARN polymérase), et nous avons déterminé les demi-vies des ARNm des ADHs.

Nous avons étudié l'effet de différents ligands exogènes du AhR (3-méthylcholanthrène, benzo(a)pyrène, PCB 126).

Un antagoniste du AhR, le CH-223131, mais aussi des SiARN dirigés contre AhR, Src et ARNT ont servi à étudier si l'activation du AhR entraînait la régulation des ADHs par la voie génomique (AhR/ARNT) ou bien par la voie non génomique (Src).

Enfin, une étude *in vivo* chez la souris a été effectuée, en utilisant les souris décrites dans le chapitre 2.

Novel roles for AhR and ARNT in the regulation of alcohol dehydrogenases in hepatic human cells

Attignon Eleonore^{1,2}, Leblanc Alix^{1,2}, Le-Grand Béatrice^{1,2}, Duval Caroline^{1,2}, Rouach Hélène^{1,2}, Aggerbeck Martine^{1,2}, Blanc Etienne^{1,2*}.

¹ INSERM UMR-S 1124, Toxicologie Pharmacologie et Signalisation Cellulaire, 45 rue des Saints Pères, 75006 Paris, France.

² Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Sorbonne Cité, CICB-Paris, 45 rue des Saints Pères, 75006 Paris, France

* corresponding author :

Dr Etienne Blanc

e-mail : etienne.blanc@parisdescartes.fr

telephone : (33) 142863360

fax : (33) 142863868

Abstract

With industrialization, exposure to pollutants has become a major concern. The mechanisms by which the pollutants lead to the development of various pathologies are not completely understood. One of the major pollutants, rejected by incomplete combustions, is the TCDD (2,3,7,8,tetracholorodibenzo-p-dioxin), a lipophilic compound, which activates the AhR (Aryl Hydrocarbon Receptor) signaling. Using a transcriptomic approach in the HepaRG cell line, we have previously shown that the expression levels of most of the alcohol metabolism enzymes (ADH1, 4, 6, CYP2E1) are decreased by a 30h exposure to TCDD 25nM.

We found that ADH and CYP2E1 gene expression decreased as soon as 8 hours after treatment with TCDD over a wide range of concentrations (0.1 nM to 25 nM). The ADHs and CYP2E1 proteins decreased after 72 h of treatment with 25 nM TCDD. The half-lives of the ADH mRNA were not modified by the TCDD treatment, which suggests a transcriptional regulation of their expression. The use of the AhR antagonist CH-223191 or siRNA directed against AhR inhibited the regulation of expression of ADHs by 25 nM TCDD, and we showed that the genomic pathway via the AHR/ARNT complex was involved, but not the c-Src non-genomic pathway. These regulations were found also in primary human hepatocytes and in mouse liver after TCDD treatment. We described a new mechanism of alcohol metabolism enzyme regulation through the AhR/ARNT signalling induced by pollutant exposure.

Key words: dioxin, alcohol metabolism, liver, HepaRG

Introduction

Modern industry has made increasing exposure to multiple pollutants a major public health concern over the last decades. Such exposure leads to the development of diverse pathologies such as chronic liver disease and cancer (Alavanja et al., 2004; White and Birnbaum, 2009). Nevertheless, the underlying mechanisms that link exposure to pollutants with these pathologies are not completely understood. The toxicity of a variety of environmental pollutants is mediated by the activation of the AhR (Aryl hydrocarbon receptor). AhR is a transcription factor of the bHLH/PAS protein family (basic helix-loop-helix/Per-ARNT-Sim), which binds compounds such as aromatic and/or polyhalogenated hydrocarbons (Barouki et al., 2007).

The prototypical AhR ligand is 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), a chemical by-product of burning or incinerating chlorinated industrial compounds. In the cytosol, the AhR forms a multi-protein complex, which consists of chaperones (HSP90, XAP2) and other proteins (*e.g.* the kinase c-Src). The binding of a ligand provokes the dissociation of this complex. The activated AhR translocates into the nucleus where it forms a heterodimer with its partner ARNT (AhR Nuclear Translocator, also called HIF-1 α). The heterodimer binds to the xenobiotic responsive element (XRE) of target genes among which are the xenobiotic metabolizing enzymes such as cytochrome P450 (CYPs) 1A1, 1A2 or 1B1 and regulates their expression (Denison et al., 2011). The adverse effects of pollutants are believed to be mediated by AhR signaling *via* the modulation of gene expression. Alternatively, the release of c-Src, a kinase, could activate the non-genomic pathway which as has been shown to contribute to the cell-migratory program (Tomkiewicz et al., 2013). Recent studies have unraveled unsuspected physiological roles and novel alternative ligand-specific pathways for this receptor (Guyot et al., 2013).

To understand further the complex regulation and the cell type specific functional disturbances mediated by the AhR and its ligands, we performed a whole genome analysis using the human derived HepaRG cell line as a model system. We found that following exposure of these cells to 25nM TCDD or 10 μ M alpha-endosulfan or their mixture for 30 hours, most of the enzymes involved in alcohol metabolism, the alcohol dehydrogenases (ADH) 1, 4, and 6, and the cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) were among the most markedly down-regulated genes (Ambolet-Camoit *et al.*, submitted). Similar results also were found in

another pangenomic study using primary human hepatocytes exposed for different times (1 to 48h) to several concentrations of TCDD (0.001 to 100nM)(Forgacs et al., 2013).

Alcohol dehydrogenases (EC 1.1.1.1) are a group of seven dehydrogenase enzymes that are present in many organisms (bacteria, yeast, plant, fish or mammals) and facilitate the interconversion of alcohols and aldehydes or ketones by oxido-reduction using NAD^+ or NADH, H^+ as co-factor. Several mechanisms involved in the regulation of their expression have been described which are specific for the isoform or the tissue. Transcription factors such as HNF1, CTF, or C/EBP (Edenberg, 2000), hormones such as glucocorticoids (Dong et al., 1988), or genomic features (AUG in 3'-UTR) have been shown to participate in these mechanisms. The regulation of ADHs by pollutants has not been studied extensively even though these enzymes are ubiquitously expressed.

In fact, doubts still remain concerning the “real” physiological role of ADHs in animals (Hernández-Tobías et al., 2011). In addition to the oxidation of alcohols, ADHs also participate in the metabolism of retinoids by catalyzing the oxidation of retinol (vitamin A) to retinal, the first step in the production of retinoic acid (RA), the active metabolite. RA is a ligand for RAR (RA Receptor) which is involved in the control of the expression of many genes and which regulates a wide range of biological processes including development, differentiation, proliferation and apoptosis (Bushue and Wan, 2010). Further, RA is of clinical interest for use in cancer chemoprevention and treatment. Interestingly, low levels of retinoids have been associated with ethanol-induced chronic liver diseases (Chung et al., 2009). Finally, ADHs also participate in lipoperoxyde elimination. For instance, in rat hepatocytes, ADH activity has been estimated to account for 10% of 4-hydroxynonenal elimination (Hartley et al., 1995).

Decreased expression of ADHs has been observed in several cancers and, recently, ADH4 and ADH1 have been proposed as prognostic markers in hepatocellular carcinoma (HCC) (Wei et al., 2012), invasive mammary cancer (Triano et al., 2003) or lung cancer (Mutka et al., 2012), respectively. Moreover, in the hepatoma cell line HepG2, decreased hepatic ADH activity has been shown to facilitate the non-oxidative metabolism of ethanol, which leads to the formation of FAEs (Fatty Acid Ethyl Ester) which can cause apoptosis (Wu et al., 2006). *In vivo*, the suppression of one or more ADHs in mice has demonstrated for this enzyme family a post-natal role in the clearance of excess retinol to prevent vitamin A toxicity and in the generation of retinoic acid (RA) for post-natal survival during vitamin A deficiency (Kumar et al., 2012).

The present study aims to further elucidate the mechanisms implicated in the regulation of ADHs by AhR ligands. We show that this regulation is mediated by the AhR/ARNT genomic pathway upon TCDD binding to AhR and not by the non-genomic pathway *via* the c-Src kinase.

Materials and methods

Compounds

TCDD (Cerilliant, #ED-901) was purchased from LGC Standards (France), 3-methyl-cholanthrene (3-MC) was purchased from Supelco (#44-2388), PCB 126 was purchased from Ultra Scientific, Italy (#RPC-12). Benzo-a-pyrene (#B1760) and CH-223191 (#C8124) were purchased from Sigma (the powders were diluted in DMSO and kept at -20°C). Oligonucleotides (table 1) were purchased from Eurogentec (France).

Cell culture

HepaRG human hepatoma cells were obtained from Dr C. Guillouzo (Aninat et al. 2006) and were cultured at 37°C in Williams medium (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Clontech), 100 units/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin, 5µg/mL insulin, 2mM glutamine and 50µM hydrocortisone hemisuccinate (Gibco) in a humidified atmosphere in 5% CO₂. Cells were seeded at a density of 2.7x10⁴ cells/cm² and, after 2 weeks, they were shifted to the same medium supplemented with 1.5% dimethyl sulfoxide (DMSO) for 2 weeks to induce differentiation. The medium was changed every 2 to 3 days. For pollutant exposure, HepaRG were trypsinized and seeded at 1.3x10⁶ cells/well into 6-well plates or at 6.6x10⁵ cells/well into 12-well plates.

Human Hepatocytes

Primary culture of human adult hepatocytes was obtained from adult patients in the Cochin Hospital. The complete isolation protocol has been previously described (Podevin et al., 2010). Forty-eight hours after plating, the cells were treated or not with 25nM TCDD.

In Vivo studies

Male and female C57Bl6/J mice, at 6 weeks of age, were randomly divided into 5

groups (n=5) in each sex. After an acclimation period of 2 weeks, mice were treated with TCDD (0.1, 1, 10 and 25 µg/kg bw) or the vehicle (corn oil) by intra peritoneal injection once every week for 7 weeks. At the end of the study, the mice were anesthetized with isoflurane and sacrificed by decapitation. The livers were removed, weighed, cut into small pieces and snap-frozen in liquid nitrogen. RNAs were purified further as described below. The murine treatment protocol was approved by the bioethical committee (n° CEEA34.MA.003.12). (complete protocol in Duval *et al.*, in preparation).

Kinetic experiments

Differentiated cells were seeded into 12-well plates and 72h later the medium was replaced and the cells were treated or not with 25nM TCDD for 4, 6, 8, 20, or 24 hours. Treatments were delayed so that all RNAs could be harvested at the same time. In other experiments, the differentiated HepaRG cells received lower doses (0.01 to 5nM) of TCDD at days 0 and 4 and the cells were harvested at day 8.

Half-life determination

Differentiated cells were seeded into 12-well plates and 72h later the medium was replaced and cells were treated or not with 25nM TCDD. After 20 hours, 100µM DRB (5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole), an RNA polymerase II inhibitor, was added and the cells were harvested 0, 4, 8, 13 and 24 hours later for the isolation of RNA. The expression of ADHs was determined by RT-qPCR.

SiRNA transfection

The transfection was performed using the reverse-transfection method. For one well of a 12-well plate, 12 pmol of siRNA were mixed with 2 µL of the lipofectamine RNAimax (Life Technologies) in 250µL of optiMEM medium (Gibco) according to the supplier's instructions. The mix was placed into the well and, afterwards, the cells were added. Seventy-two hours later, the medium was replaced and the cells were treated or not with 25nM TCDD. RNA purification and protein extraction were carried out 24h and 72h, respectively, after treatment. The siRNA were purchased from Dharmacon (Thermo Scientific) as On-Target plus Smart pool with the following references: control, #D-001810-10-05; AHR, #L-003175-00; ARNT, #L-007207-00; SRC, #L-003175-00.

RNA isolation

RNAs from differentiated HepaRG cells were prepared using the Mammalian Total RNA Miniprep kit (Sigma) according to the manufacturer's instructions. RNAs from mouse liver were obtained using TRIzol® (Invitrogen) reagent. About 50 mg of liver were crushed in 1 mL of TRIzol in the presence of 3 steel beads using a TissueLyser (2 min, 20 Hz). Two hundred μ L of chloroform were added and, after centrifugation, the aqueous phase on the top was recovered and mixed with an equal volume of 70% ethanol and put on a Qiagen column (RNeasy mini kit). The manufacturer's instructions then were followed, including the DNase step. The RNA quantity and purity were assessed with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer.

Reverse Transcriptase qPCR

One μ g of total RNA was reverse transcribed into cDNA using the cDNA High-Capacity Archive Kit from Applied Biosystems (Courtaboeuf, France) in a final reaction volume of 20 μ L. After transcription, 30 μ L of water were added to each tube. All specific oligonucleotides were designed using the OLIGO Explorer software or found in the literature (Table 1). Quantitative RT-PCR was carried out using 20ng of cDNA, 300 nM of each primer and Absolute QPCR SYBR-Green (Abgene, Villebon-sur-Yvette, France) in a final volume of 10 μ L, in duplicates. Measurements were made using an ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). PCR cycles were as follows: Taq activation (15 min), denaturation (15 s, 95°C), annealing and extension (1 min, 60°C). The relative mRNA levels were estimated using the delta-delta C_t method using RPL13A as the reference gene for human cells and GAPDH for mice.

Immunoblotting

Cells were scraped into RIPA buffer (1X PBS, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 1% NP40). Equal amounts of total proteins were separated by SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. The membrane was saturated with Odyssey buffer (LI-COR, ScienceTec) for 1 hour at room temperature and then incubated overnight at 4°C with the primary antibody under constant shaking. The antibodies used were: pan-ADH1 (Acris, #AP16311PU-N), ADH4 (ABGENT, #AP10128b), β -actin (Abcam, #8226), α -tubulin (Sigma, #T9026). After three washes with 0.1% Tween-20 phosphate buffered saline (PBS), the membrane was incubated with the corresponding IRdye800 or IRdye680 secondary

antibody (ScienceTec, Courtaboeuf, France). After the final washes, signals were measured using an Odyssey Infrared Imager (LI-COR, ScienceTec) and quantified with the resident software (Odyssey Infrared Imaging System 3.0).

Statistical analysis

The data are expressed as the mean $\pm$ SD of at least three different experiments. Statistical analysis was carried out using successively Mann–Whitney’s U-test (nonparametric comparison of two independent series) or H Kruskal-Wallis test (nonparametric comparison of k independent series) followed by a one-factor analysis of variance test (parametric comparison of k independent series). A p-value <0.05 was considered as statistically significant. * or # : $p<0.05$; ** or ## : $p<0.005$; *** $p<0.001$.

Results

Effect of TCDD on the expression of alcohol metabolizing enzymes

A pangenomic analysis of the transcripts expressed by HepaRG cells, treated or not with 25nM TCDD for 30 hours, showed a decrease in the expression of the genes encoding alcohol metabolizing enzymes: CYP2E1, ADH1A, ADH1B, ADH1C, ADH4(II) and ADH6(V) (table 2) (Ambolet-Camoit *et al.*, submitted). In the present paper, the Pubmed convention is used for the ADH name, and the class, according to Duester and coll (Duester *et al.*, 1999) is specified under brackets. Using quantitative RT-PCR, we found that a significant decrease in CYP2E1, ADH1A, ADH1B, ADH1C, ADH4(II) mRNA expression was observed as soon as 8h after exposure of cells to 25nM TCDD (Figure 1A,). Further, a significant decrease in expression of these genes is observed after 24 hours of exposure of the cells to concentrations as low as 0.1nM and the decrease in expression was dose-dependent (Figure 1B). However, no change in the amounts of the corresponding proteins was observed following exposure of the cells to 25nM TCDD for 24 hours (data not shown). In contrast, after 72h, the amounts of CYP2E1, ADH4 and ADH1 protein were significantly decreased (Figure 1C). To determine whether this regulation is specific to ADHs1, 4 and 6, we measured the level of expression of ADH5(III) which is expressed in all tissues. TCDD did not change the level of expression of ADH5(III) (data not shown). ADH7(IV), the last member of the family, is not expressed in the liver.

We also exposed the cells for longer periods of time (up to 8 days) to lower concentrations of TCDD (0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 and 5nM). These concentrations of the pollutant are more representative of environmental exposure. No increase in cell mortality was observed under these conditions (Supplemental Figure). The expression was significantly decreased for all the ADHs at concentrations as low as 0.1nM TCDD (40% decrease) and is shown for ADH1B and ADH4 (Figure 1D).

Effect of TCDD on mRNA stability

To determine whether the decreases in the levels of ADH mRNAs following treatment of the cells with TCDD were due to transcriptional or post-transcriptional regulation, the half-lives of the mRNAs of several ADHs (ADH1A, ADH1B, ADH4(II) and ADH6(V)) were determined using qRT-PCR. The cells were exposed for 20h to 25nM TCDD and then DRB

(100 μ M), an inhibitor of RNA polymerase II, was added. The half-lives of the mRNA of were then measured at several time points following DRB treatment. The values for the half-lives of the ADHs were about 10 hours in control cells and were not modified significantly by exposure of the cells to TCDD (Figure 2). This suggests that the regulation of the level of mRNA expression by TCDD is likely at the level of transcription.

Effect of AHR ligands on mRNA levels

TCDD binds specifically to the aryl hydrocarbon receptor (AhR). The AhR, however, recognizes a large number of other xenobiotics and it activates several detoxification and metabolic pathways. Recent evidence suggests that this receptor also has endogenous functions subsequent to activation by natural dietary compounds and/or endogenous metabolites. Thus, we wondered if ligands other than TCDD could also regulate the expression of the alcohol metabolizing enzymes. We chose to investigate the effects on the expression of ADHs of 3 compounds: 3-methyl-cholanthrene (3-MC) (5 μ M), PCB 126 (1 μ M, the most potent of the dioxin-like PCBs), and benzo[a]pyrene (BaP) (1 μ M). Exposure of HepaRG cells for 24h to 3-MC (5 μ M) and PCB 126 (1 μ M), known to be potent agonists of AhR, leads to the down-regulation of ADH1B, 4 and 6 (Figure 3). BaP at 1 μ M does not have any significant effect on the expression of these ADHs. The level of CYP1A1 mRNA was used to assess the activation of the AhR signaling pathway. A strong correlation between the level of expression of ADH4(II) ($R^2=0.86$) and CYP2E1 ($R^2=0.80$) and that of CYP1A1 was found (Figure 4). These results suggest the implication of the AhR signaling pathway in the regulation of the level of alcohol metabolizing enzymes mRNA following treatment of cells with these xenobiotics.

Effect of an AhR antagonist and siAhR on mRNA regulation

To evaluate the role of the AhR in the regulation of ADH expression by TCCD, we first used a specific antagonist of the AhR, CH-223191. We analyzed the effect of two concentrations of CH-223191: 1 μ M (known to inhibit, *in vitro*, more than 90% of the binding of AhR to the XRE consensus site after TCDD treatment (Kim et al., 2006) and 10 μ M CH-223191 (estimated to attain 100% inhibition). We observed an inhibition by CH-223191 of the basal level of expression of CYP1A1 (used as a control for AhR signaling) but not of the expression of the ADHs (Table 3, columns 2 and 3). At a concentration as low as 1 μ M, CH-

223191 prevented the decrease in the level of expression of all ADHs caused by 3nM TCDD (Table 3, compare columns 4 and 5). However, the same concentration of CH-223191 inhibits only partially the effect of 25nM TCDD (Table 3, compare columns 7 and 8). These results indicate that the binding of TCDD to the AhR is necessary for the regulation of expression of the ADH genes.

Finally, to confirm the role of AhR in this regulation, specific siRNA targeting the AhR mRNA were used to invalidate AhR expression. After transfection, HepaRG cells were treated or not with 25nM TCDD for 24 or 72 hours and the levels of mRNA and protein, respectively, were measured. The siAhR inhibits up to 90% the expression of the AhR mRNA (Figure 5), and reduced the basal expression of CYP1A1 and its induction by TCDD (Table 4), thus showing an important inhibition of this pathway. These observations are consistent with the effects of the antagonist CH-223191. Further, AhR acting as a transcription factor appears to be involved in the regulation of expression of the ADH genes as shown by the following results. siAhR transfection abolished the decrease in expression of ADH1A(I), ADH1B(I), ADH4(II) and ADH6(V) resulting from exposure of cells TCDD (Table 4). As expected, under these conditions, no effect was observed on the expression of ADH5(III). We also verified that the basal level of expression of the alcohol metabolizing enzymes was not modified by siAhR (Table 4), indicating that the AhR is not implicated in the constitutive transcription of these genes.

Effect of siARNT and siSrc on mRNA regulation

It has been suggested that the effects of TCDD, *via* its binding to the AhR, are implemented by two different pathways. The first one, the genomic pathway, involves the dimerization of the AhR with its partner ARNT (Ah Receptor Nuclear Translocator) to transactivate their target genes. The second one, the non-genomic pathway, involves the release of the kinase Src, originally a member of the cytoplasmic complex containing the AhR, after the binding of TCDD to the AhR. Src, then, is activated and can phosphorylate its target proteins thus leading to intra-cellular signaling. To discriminate between these two pathways for the effects of TCDD on ADH expression, we transfected HepaRG cells with siRNA against ARNT and Src. The expression of both ARNT or Src was specifically decreased by their respective siRNA (70% and 75%, respectively), and no cross-effect was

observed (Figure 6A and B). CYP1A1 basal expression was only affected by siARNT (normalized gene expression=0.4 for siARNT as compared to 0.8 for siSRC, Figure 6C).

Reduction of c-Src expression by siSRC did not eliminate the inhibition of expression of the ADHs by TCDD (Figure 6D, last column) since the levels of inhibition remaining are not statistically different from those obtained with siC (the scrambled control). In contrast, invalidation of ARNT by siARNT reduced significantly the inhibitory effect of TCDD (two fold less inhibition, Figure 6D, middle column). These results strongly suggest that the regulation of the expression of the ethanol metabolizing enzymes by TCDD is mediated by the genomic signaling pathway through the formation of the AHR/ARNT complex. Interestingly, the basal levels of expression of CYP2E1, ADH4, and, to a lesser extent, that of ADH6 were increased (up to 1.5 fold) following transfection of cells with siARNT (data not shown). These results suggest that ARNT could exert a constitutive control of the expression of these genes.

Effects of TCDD in primary human hepatocytes on alcohol metabolizing enzymes

We next used human hepatocytes in primary culture to analyze the expression of the ADH genes in a model more representative of the human liver (figure 7). The levels of expression of ADH1A, 1B, CYP2E1 and, to a lesser extent, of ADH6 were significantly decreased by exposure to 25nM TCDD after 24h of treatment and even more after 48h. Unexpectedly, we observed an increase of the expression of ADH4(II) mRNA. These results tend to confirm the effect of TCDD on the expression of ADH in normal human hepatocytes.

Effects of TCDD in vivo on alcohol metabolizing enzymes

We finally used a murine model to investigate the regulation of the ADH genes *in vivo*. Mice received IP injections of TCCD (0. 0.1, 1, 10 and 25 µg/kg bw) once every week for 7 weeks. The level of expression of hepatic ADH4(II) decreased in both sexes although females seemed to be more sensitive (IC_{50} between 0.1 and 1 µg/kg as compared to $IC_{50}>10\mu\text{g/kg}$ for males) (figure 8). In contrast, neither the expression of ADH1 (data not shown) nor that of CYP2E1 was changed upon treatment of the mice with TCDD (Figure 8).

Discussion

Environmental pollutants have been implicated in liver carcinogenesis, fibrosis, steatosis and in the alteration of liver metabolic functions (Pierre et al., 2014) ; (Lee *et al.*, 2010). Here, we show that, both in *in vitro* and *in vivo* models, TCDD down-regulates drastically the expression of most of the genes encoding alcohol metabolizing enzymes (ADH1A, B, C, ADH 4 and ADH6) and their related proteins. Our results are consistent with literature reporting results of pangenomic studies from other laboratories analyzing the effect of TCDD with other concentrations, times or cellular models (Lo et al., 2011; Forgacs et al., 2013) Even though the authors did not discuss this point, their results show a decrease in the mRNA level expression of ADH1A, ADH1C and ADH4, in human hepatocytes, after 24h or 48h exposure of 10nM TCDD. In our study, we also found that the mRNA expression of ADHs was decreased by 25nM TCDD in primary human hepatocytes at those times. Unexpectedly, the expression of ADH4(II) was increased in our study and further investigations must be done to explain this particular regulation. The expression of another alcohol metabolizing enzyme, CYP2E1, is also down-regulated by TCDD in the HepaRG cell line. This down-regulation of CYP2E1 has been shown to result through H₂O₂ released by CYP1A1 induction and activity in the HepG2 model (Morel et al., 2000). In the HepaRG model, we found that antioxidants, such as N-Acetyl Cystein, do not affect the changes in expression of ADH resulting from exposure of cells to TCDD (E Blanc, personal data). These results thus exclude a role for oxidative stress in this regulation.

The lack of change in the mRNA half-lives for the ADHs found after treatment of cells with TCDD suggests that the regulation is likely transcriptional. Using complementary siRNA and pharmacological approaches, we demonstrated that the AhR/ANRT complex is implicated in the regulation of the ADH. Further, we excluded a role for the non-genomic AhR pathway (Src activation). The AhR/ANRT dimer acts through a consensus sequence in the DNA, the XRE (xenobiotic responsive element), which usually promotes the over-expression of target genes. However, few examples of decreased gene expression by the AhR have been described. Nevertheless, an inhibitory cross-talk between the AhR and the ER has been reported leading, for instance, to the repression of cathepsin D expression by 17 β -estradiol through the interactions of AhR/ARNT with a GCGTG (iDRE) motif (Wang et al., 2001). *In silico* analysis shows few and relatively distal XREs in the human ADH promoters. However, ChIP-Seq analysis did not show any interaction between the AhR/ARNT complex and the promoter of any ADH (Lo and Matthews, 2012). The regulation of the ADH by

TCDD/AhR might thus be mediated by another transcriptional mechanism as suggested to explain the negative regulation of NPC1 by benzo[a]pyrene activation of ARNT/AHR pathway in macrophage (Podechard et al., 2009).

In humans, consensus cis-acting elements for various transcription factors have been described in the proximal promoters of ADHs: HNFs (Hepatocyte Nuclear Factor), TCF/LEF (T-cell Factor / Lymphoid Enhancing Factor), USF (Upstream Stimulatory factor) or C/EBP (CCAAT/Enhancer Binding Protein) (Edenberg, 2000). Even though few promoter studies have been performed, HNF3 β (Dannenberg et al., 2005), C/EBP (Stewart et al., 1991), and SREBP (He et al., 2004) have been shown to regulate positively the ADH1 expression, and HNF3 has been shown to activate ADH4 expression (Pochareddy et al., 2010). The whole genome transcriptome analysis of HepaRG cells exposed 30h to 25nM TCDD that we previously performed, did not show any significant modification in the levels of mRNA for the above transcription factors (Ambolet-Camoit et al., personal data). In the mouse, Smad3, STAT5, TCF/LEF, SREBP, and C/EBP regulating motifs in the promoter of *adh1* have also been detected *in silico*. The Smad3 responsive element has been shown to be functional and sensitive to the TGF- β signaling pathway (Ciuculan et al., 2010). The TGF- β decreases the expression of *adh1* in the liver of the mice, which may be linked to the appearance of hepatic fibrotic features. TCDD can regulate the expression or activation of some transcriptional factors. For example, in a rat model, the expression of C/EBP, HNF-1a and HNF-4 decreased after 14 days of TCDD treatment (Bauman et al., 1995). More studies of the promoter cis-acting elements and activity are required to decipher the intermediate(s) involved in the regulation of the expression of the ADHs by TCDD in the HepaRG cellular model.

The prime function of ADH is to oxidize ethanol into acetaldehyde, to facilitate its elimination or its integration into energy metabolism *via* the production of acetate. With a decrease in ADH expression, after exposure to TCDD or other AhR ligands, the hepatic oxidation would be greatly decreased in favor to non-oxidative pathways such as the formation of FAEEs (Fatty Acid Ethyl Ester), which are known to possess toxic effects (Zelner et al., 2013). Besides, the pharmacokinetic and the half-life of the ethanol molecule would be modified. The alcoholic impregnation of extra-hepatic tissues, in particular the brain, also would be increased leading to more intense neurotoxicity.

Given the conservation of ADH genes, these enzymes could have roles other than the oxidation of ethanol after ingestion of alcohol. It should be noted that ADH1 and ADH4 expression have been described as potential prognostic markers in different cancers, including

HCC (Triano et al., 2003; Mutka et al., 2012; Wei et al., 2012). Nevertheless, the authors have not proposed any mechanism of regulation. Even if the mechanism for the decreased expression of ADHs is unknown, it would be interesting to understand the consequence of this regulation as related to their metabolic functions. One characteristic of ADHs is their ability to reduce aldehyde breakdown products of lipid hydroperoxides, such as 4-hydroxynonenal, generated by lipid peroxidation (Sellin et al., 1991). An association between excess lipoperoxidation by-products and chronic liver diseases (steatosis, fibrosis, cirrhosis and HCC) has been shown in various studies (Parola and Robino, 2001; Sebastiani et al., 2011). In this respect, ADH may then have protective properties.

The other function of ADH relevant with cancer is the oxidation of retinol to retinal (Hellgren et al., 2007). Retinal is the precursor of retinoic acid (RA) which is a major mediator required, for instance, for maintaining epithelia in a differentiated state via RAR binding. This oxidation also prevents the toxicity of high doses of vitamin A. Selective ADH knock-out mice exhibit defects in retinoid metabolism (Kumar et al., 2012). The decrease in expression of ADHs by TCDD might lead to an accumulation of retinol and to a deficit in retinoic acid and, thus, promote the observed incidence of liver diseases. The effects could be counteracted by the fact that TCDD also induces *ALDH1A3*, which can irreversibly oxidize the small amount of retinaldehyde produced. Interestingly, AhR signaling is involved in retinoid metabolism (Novák et al., 2008) and retinoid derivatives have been proposed to repress the development of liver fibrosis and tumors (Okada et al., 2012). The link between TCDD, or other AhR ligands, and the regulation of retinoid metabolism needs to be considered and further explored in the context of this study.

Bibliography

- Alavanja, M.C.R., Dosemeci, M., Samanic, C., Lubin, J., Lynch, C.F., Knott, C., Barker, J., Hoppin, J.A., Sandler, D.P., Coble, J., et al. (2004). Pesticides and lung cancer risk in the agricultural health study cohort. *Am. J. Epidemiol.* 160, 876–885.
- Aninat, C., Piton, A., Glaise, D., Le Charpentier, T., Langouët, S., Morel, F., Guguen-Guillouzo, C., Guillouzo, A. (2006) Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in huma, hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab. Dispos.* 34, 75-83.
- Barouki, R., Coumoul, X., and Fernandez-Salguero, P.M. (2007). The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Lett.* 581, 3608–3615.
- Bauman, J.W., Goldsworthy, T.L., Dunn, C.S., and Fox, T.R. (1995). Inhibitory effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on rat hepatocyte proliferation induced by 2/3 partial hepatectomy. *Cell Prolif.* 28, 437–451.
- Bushue, N., and Wan, Y.-J.Y. (2010). Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62, 1285–1298.
- Chung, J., Veeramachaneni, S., Liu, C., Mernitz, H., Russell, R.M., and Wang, X.-D. (2009). Vitamin E supplementation does not prevent ethanol-reduced hepatic retinoic acid levels in rats. *Nutr. Res. N. Y.* N 29, 664–670.
- Ciucan, L., Ehnert, S., Ilkavets, I., Weng, H.-L., Gaitantzi, H., Tsukamoto, H., Ueberham, E., Meindl-Beinker, N.M., Singer, M.V., Breitkopf, K., et al. (2010). TGF-beta enhances alcohol dependent hepatocyte damage via down-regulation of alcohol dehydrogenase I. *J. Hepatol.* 52, 407–416.
- Dannenberg, L.O., Chen, H.-J., and Edenberg, H.J. (2005). GATA-2 and HNF-3beta regulate the human alcohol dehydrogenase 1A (ADH1A) gene. *DNA Cell Biol.* 24, 543–552.
- Denison, M.S., Soshilov, A.A., He, G., DeGroot, D.E., and Zhao, B. (2011). Exactly the same but different: promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 124, 1–22.
- Dong, Y., Poellinger, L., Okret, S., Höög, J.O., von Bahr-Lindström, H., Jörnvall, H., and Gustafsson, J.A. (1988). Regulation of gene expression of class I alcohol dehydrogenase by glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 767–771.
- Duester, G., Farrés, J., Felder, M.R., Holmes, R.S., Höög, J.O., Parés, X., Plapp, B.V., Yin, S.J., and Jörnvall, H. (1999). Recommended nomenclature for the vertebrate alcohol dehydrogenase gene family. *Biochem. Pharmacol.* 58, 389–395.
- Edenberg, H.J. (2000). Regulation of the mammalian alcohol dehydrogenase genes. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 64, 295–341.
- Forgacs, A.L., Dere, E., Angrish, M.M., and Zacharewski, T.R. (2013). Comparative analysis of temporal and dose-dependent TCDD-elicited gene expression in human, mouse, and rat primary hepatocytes. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 133, 54–66.
- Guyot, E., Chevallier, A., Barouki, R., and Coumoul, X. (2013). The AhR twist: ligand-dependent AhR signaling and pharmaco-toxicological implications. *Drug Discov. Today* 18, 479–486.
- Hartley, D.P., Ruth, J.A., and Petersen, D.R. (1995). The hepatocellular metabolism of 4-hydroxynonenal by alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, and glutathione S-transferase.

Arch. Biochem. Biophys. 316, 197–205.

He, L., Simmen, F.A., Ronis, M.J.J., and Badger, T.M. (2004). Post-transcriptional regulation of sterol regulatory element-binding protein-1 by ethanol induces class I alcohol dehydrogenase in rat liver. *J. Biol. Chem.* 279, 28113–28121.

Hellgren, M., Strömberg, P., Gallego, O., Martras, S., Farrés, J., Persson, B., Parés, X., and Höög, J.-O. (2007). Alcohol dehydrogenase 2 is a major hepatic enzyme for human retinol metabolism. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 64, 498–505.

Hernández-Tobías, A., Julián-Sánchez, A., Piña, E., and Riveros-Rosas, H. (2011). Natural alcohol exposure: is ethanol the main substrate for alcohol dehydrogenases in animals? *Chem. Biol. Interact.* 191, 14–25.

Kim, S.-H., Henry, E.C., Kim, D.-K., Kim, Y.-H., Shin, K.J., Han, M.S., Lee, T.G., Kang, J.-K., Gasiewicz, T.A., Ryu, S.H., et al. (2006). Novel compound 2-methyl-2H-pyrazole-3-carboxylic acid (2-methyl-4-o-tolylazo-phenyl)-amide (CH-223191) prevents 2,3,7,8-TCDD-induced toxicity by antagonizing the aryl hydrocarbon receptor. *Mol. Pharmacol.* 69, 1871–1878.

Kumar, S., Sandell, L.L., Trainor, P.A., Koentgen, F., and Duester, G. (2012). Alcohol and aldehyde dehydrogenases: retinoid metabolic effects in mouse knockout models. *Biochim. Biophys. Acta* 1821, 198–205.

Lee, J.H., Wada, T., Febbraio, M., He, J., Matsubara, T., Lee, M.J., Gonzalez, F.J., Xie, W. (2010). A novel role for the dioxin receptor in fatty acid metabolism and hepatic steatosis. *Gastroenterology* 139, 653–663.

Lo, R., and Matthews, J. (2012). High-resolution genome-wide mapping of AHR and ARNT binding sites by ChIP-Seq. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 130, 349–361.

Lo, R., Celiuș, T., Forgacs, A.L., Dere, E., MacPherson, L., Harper, P., Zacharewski, T., and Matthews, J. (2011). Identification of aryl hydrocarbon receptor binding targets in mouse hepatic tissue treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 257, 38–47.

Morel, Y., de Waziers, I., and Barouki, R. (2000). A repressive cross-regulation between catalytic and promoter activities of the CYP1A1 and CYP2E1 genes: role of H(2)O(2). *Mol. Pharmacol.* 57, 1158–1164.

Mutka, S.C., Green, L.H., Verderber, E.L., Richards, J.P., Looker, D.L., Chlipala, E.A., and Rosenthal, G.J. (2012). ADH IB expression, but not ADH III, is decreased in human lung cancer. *PloS One* 7, e52995.

Novák, J., Benísek, M., and Hilscherová, K. (2008). Disruption of retinoid transport, metabolism and signaling by environmental pollutants. *Environ. Int.* 34, 898–913.

Okada, H., Honda, M., Campbell, J.S., Sakai, Y., Yamashita, T., Takebuchi, Y., Hada, K., Shirasaki, T., Takabatake, R., Nakamura, M., et al. (2012). Acyclic retinoid targets platelet-derived growth factor signaling in the prevention of hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma development. *Cancer Res.* 72, 4459–4471.

Parola, M., and Robino, G. (2001). Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J. Hepatol.* 35, 297–306.

Pierre, S., Chevallier, A., Teixeira-Clerc, F., Ambolet-Camoit, A., Bui, L.-C., Bats, A.-S., Fournet, J.-C., Fernandez-Salguero, P., Aggerbeck, M., Lotersztajn, S., et al. (2014). Aryl hydrocarbon receptor-

- dependent induction of liver fibrosis by dioxin. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 137, 114–124.
- Pochareddy, S. and Edenberg, H.J. (2010) Identification of a FOXA-dependent enhancer of human alcohol dehydrogenase 4 (ADH4). *Gene*. 460, 1-7.
- Podechard, N., Le Ferrec, E., Rebillard, A., Fardel, O., and Lecureur, V. (2009). NPC1 repression contributes to lipid accumulation in human macrophages exposed to environmental aryl hydrocarbons. *Cardiovasc. Res.* 82, 361–370.
- Podevin, P., Carpentier, A., Pène, V., Aoudjehane, L., Carrière, M., Zaïdi, S., Hernandez, C., Calle, V., Méritet, J.-F., Scatton, O., et al. (2010). Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes. *Gastroenterology* 139, 1355–1364.
- Sebastiani, G., Gkouvatsos, K., Maffettone, C., Busatto, G., Guido, M., and Pantopoulos, K. (2011). Accelerated CCl₄-induced liver fibrosis in H₂O₂^{-/-} mice, associated with an oxidative burst and precocious profibrogenic gene expression. *PloS One* 6, e25138.
- Sellin, S., Holmquist, B., Mannervik, B., and Vallee, B.L. (1991). Oxidation and reduction of 4-hydroxyalkenals catalyzed by isozymes of human alcohol dehydrogenase. *Biochemistry (Mosc.)* 30, 2514–2518.
- Stewart, M.J., Shean, M.L., Paeper, B.W., and Duester, G. (1991). The role of CCAAT/enhancer-binding protein in the differential transcriptional regulation of a family of human liver alcohol dehydrogenase genes. *J. Biol. Chem.* 266, 11594–11603.
- Tomkiewicz, C., Herry, L., Bui, L.-C., Métayer, C., Bourdeloux, M., Barouki, R., and Coumoul, X. (2013). The aryl hydrocarbon receptor regulates focal adhesion sites through a non-genomic FAK/Src pathway. *Oncogene* 32, 1811–1820.
- Triano, E.A., Slusher, L.B., Atkins, T.A., Beneski, J.T., Gestl, S.A., Zolfaghari, R., Polavarapu, R., Frauenhoffer, E., and Weisz, J. (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.
- Wang, F., Samudio, I., and Safe, S. (2001). Transcriptional activation of cathepsin D gene expression by 17 β -estradiol: mechanism of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition. *Mol. Cell. Endocrinol.* 172, 91–103.
- Wei, R.-R., Zhang, M.-Y., Rao, H.-L., Pu, H.-Y., Zhang, H.-Z., and Wang, H.-Y. (2012). Identification of ADH4 as a novel and potential prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* 29, 2737–2743.
- White, S.S., and Birnbaum, L.S. (2009). An overview of the effects of dioxins and dioxin-like compounds on vertebrates, as documented in human and ecological epidemiology. *J. Environ. Sci. Health Part C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 27, 197–211.
- Wu, H., Cai, P., Clemens, D.L., Jerrells, T.R., Ansari, G.A.S., and Kaphalia, B.S. (2006). Metabolic basis of ethanol-induced cytotoxicity in recombinant HepG2 cells: role of nonoxidative metabolism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 216, 238–247.
- Zelner, I., Matlow, J.N., Natekar, A., and Koren, G. (2013). Synthesis of fatty acid ethyl esters in mammalian tissues after ethanol exposure: a systematic review of the literature. *Drug Metab. Rev.* 45, 277–299.

Species	Gene	Sequence
Human	AHR	5'- ACA TCA CCT ACG CCA GTC GC -3' 5'- TCT ATG CCG CTT GGA AGG AT -3'
	ARNT	5'- ACC AGC CAC AGT CTG AAT G -3' 5'- TCT CCT TGA GCC CAT ACA C -3'
	c-SRC	5'- CTG AGG AGT GGT ATT TTG GC -3' 5'- GGC GTG TTT GGA GTA GTA GG -3'
	CYP1A1	5'- GGT CAA GGA GCA CTA CAA AAC C -3' 5'- TGG ACA TTG GCG TTC TCA T -3'
	CYP-2E1	5'- ACT ATG GGA TGG GGA AAC AG -3' 5'- GAG GAT GTC GGC TAT GAC G -3'
	ADH1A(I)	5'- AAA AAA ATA AAT AAA TAC CTA TGC -3' 5'- CGT GGT CAT CTG TGC CA -3'
	ADH1B(I)	5'- TGC CCC ACA TTT TAC TAC AG -3' 5'- TGC CAT CCC ATC TCT ACA C -3'
	ADH1C(I)	5'- CTG CTT CGC TCT GGA AAG -3' 5'- GAG GAG GCT GAA AAC TGC -3'
	ADH4(II)	5'- GCA TTG AAG AGG TTG AAG TAG C -3' 5'- GAT AAC AGT GGC ATC AGT ATG G -3'
	ADH5(III)	5'- GGT GCT GCT GTG AAC ACT G -3' 5'- CTC CTC CAT CGG TCA TCT C -3'
	ADH6(V)	5'- GGA AGT TCG CAT AAA GGT TG -3' 5'- CAA GAT GGT GGG ATA CAA GAG -3'
	RPL13A	5'- CCT GGA GGA GGA GAG GAA AGA GA -3' 5'- GAG GAC CAC TGT GTA TTT GTC AA -3'
Mouse	adh1	5'- AGG AGG GAA GAA GTC TAC AAG G -3' 5'- AGG GGA AAA GAG TGG AAT GAC -3'
	adh4	5'- CAC CGA TCC TAA GAA GAA AGC -3' 5'- TAT GGC AGA AAG ACC TAC ACA C -3'
	cyp2E1	5'- AAT GGG GAA ACA GGG TAA TG -3' 5'- AGA AAG GTA GGG TCA AAA GGC -3'
	gapdh	5'- GTG GAC CTC ATG GCC TAC AT -3' 5'- TGT GAG GGA GAT GCT CAG TG -3'

Table 1 : Oligonucleotide sequences of primers used in qRT-PCR

Gene symbol	Gene Name	mRNA fold change by TCDD*	
		microarray	qRT-PCR
ADH1A	Alcohol dehydrogenase 1A (Class I) , α -polypeptide	0.6	0.4
ADHB	Alcohol dehydrogenase 1B (Class I) , β -polypeptide	0.65	0.32
ADH1C	Alcohol dehydrogenase 1A (Class I) , γ -polypeptide	0.55	0.41
ADH4	Alcohol dehydrogenase 1A (Class II) , π -polypeptide	0.38	0.29
ADH6	Alcohol dehydrogenase 1A (Class V)	0.56	0.49
CYP2E1	Cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1	0.51	0.41

Table 2

*: Normalized gene expression of ADHs and CYP2E1 measured by either microarray experiments (Ambolet-Camoit et al, manuscript submitted) or qRT-PCR. The mRNA fold change for each gene corresponds to the ratio of mRNA expression for cells exposed to 25nM TCDD for 30 hours as compared to untreated cells. The values are the means of at least three independent experiments.

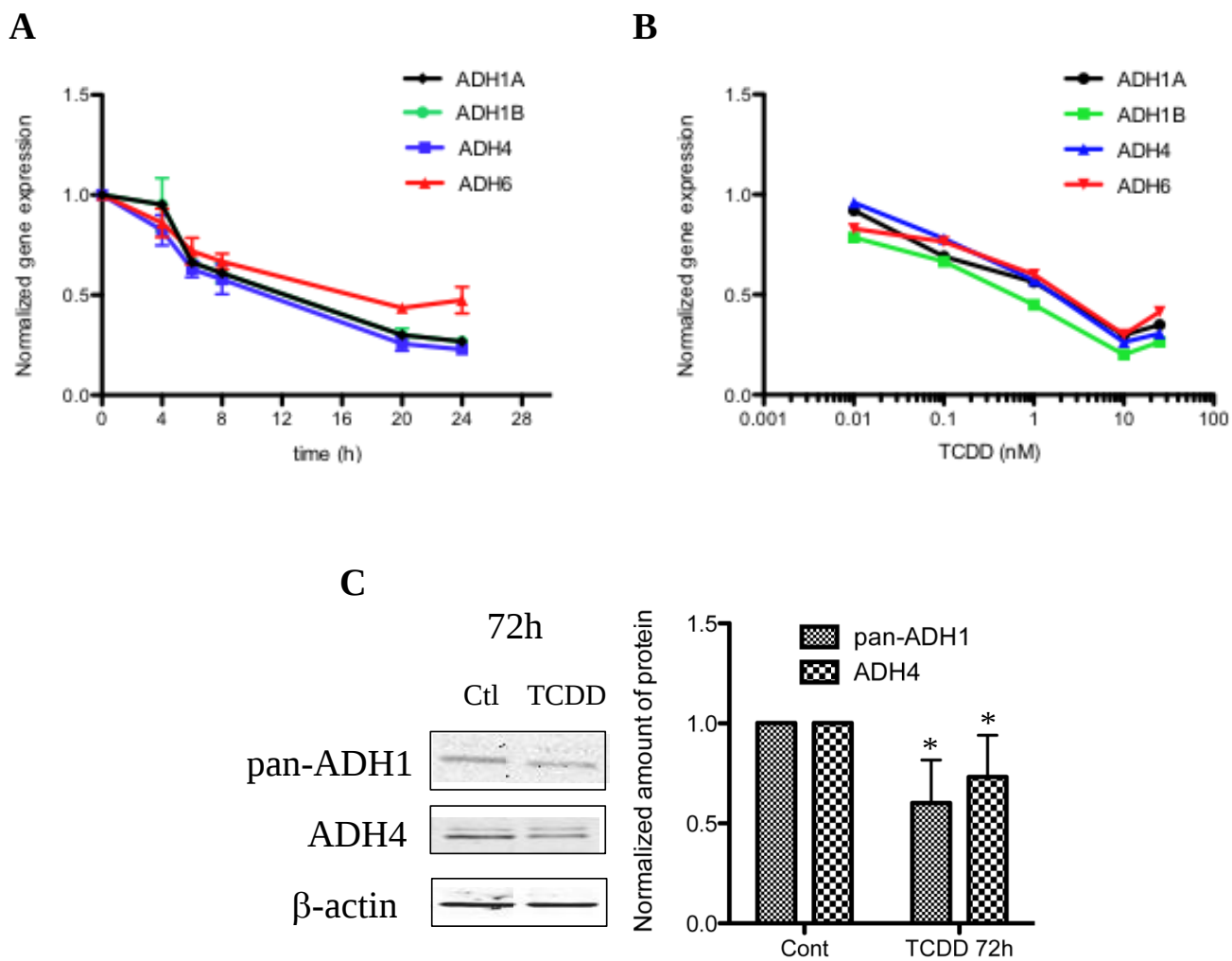


Figure 1. The expression of ADHs are regulated by TCDD.

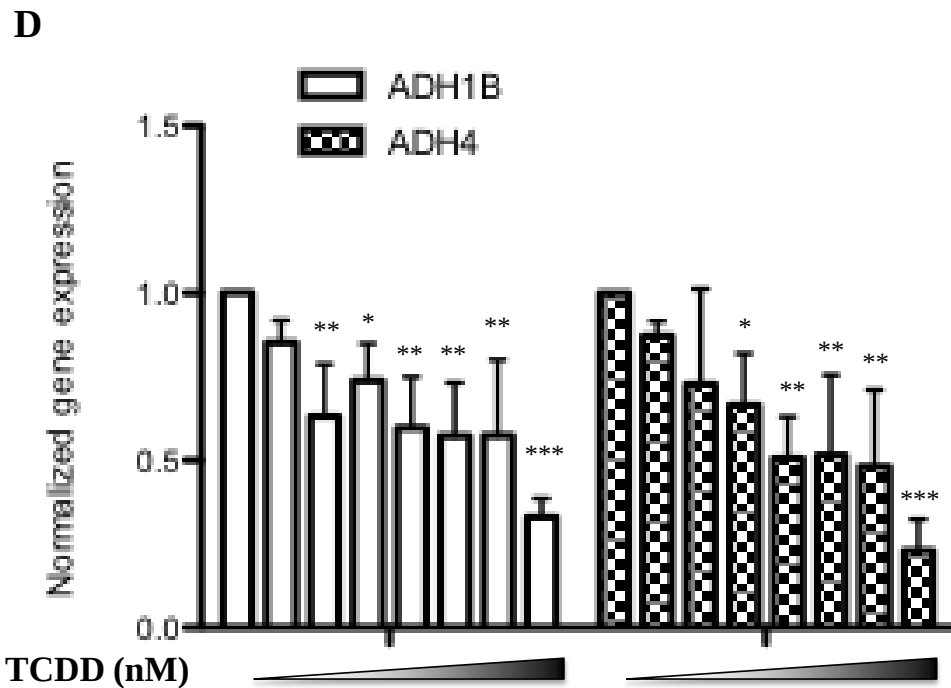


Figure 1 : The expression of ADHs are regulated by TCDD.

A/B : Quantitative real-time PCR analysis of ADH (ADH1B and 4) mRNA expression as a function of time (0–24 h, 25 nM TCDD) (A) and as a function of the concentration of TCDD (0–25 nM for 24 h) (B) in differentiated human hepatocarcinoma HepaRG cells. mRNA levels were normalized relative to the level of expression at 0nM TCDD for A and at 0 hours for B. Significant decrease in ADHs mRNA expression was observed as soon as 8h after exposure of cells, and a significant decrease in expression of these genes is observed after 24 hours of exposure of the cells at 0.1nM.

C : Western blot analysis and quantification of pan-ADH1 and ADH4 protein levels after exposure of cells for 24h or 72h to 25nM TCDD. Decrease in ADH expression appears after 72 hours of exposure. b-actin was used as a loading control.

D : Quantitative real-time PCR analysis of ADH (ADH1A, 1B, 1C, 4, 5 and 6) mRNA expression after 8 days of treatment at several concentrations of TCDD (0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 and 5nM). The decrease of expression of ADHs is dose-dependent and statistically significant from 0.1nM to 5nM.

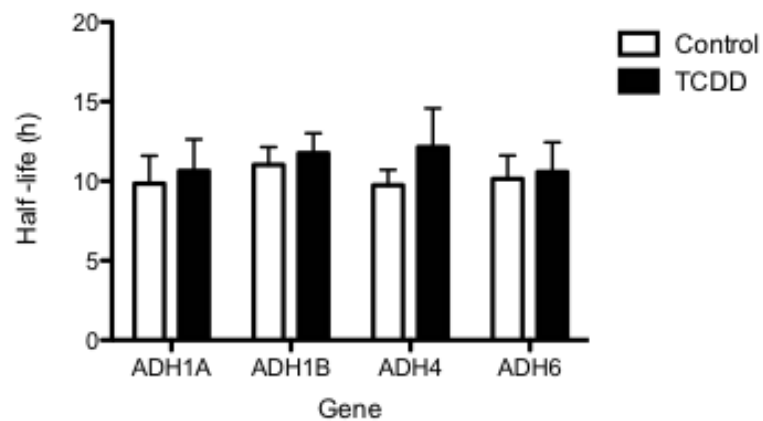


Figure 2 : The half-lives of ADH mRNA are unchanged after TCDD treatment

The half-lives of ADH mRNAs as measured by relative quantitative real-time PCR in the presence of DRB, an inhibitor of RNA polymerase II in non-treated (Control) and TCDD-treated (TCDD) HepaRG cells are shown. Cells were treated or not with 25 nM TCDD for 20h then with DRB and subsequently harvested at 0, 4, 8, 12 and 24 hours. The values are the means of three independent experiments.

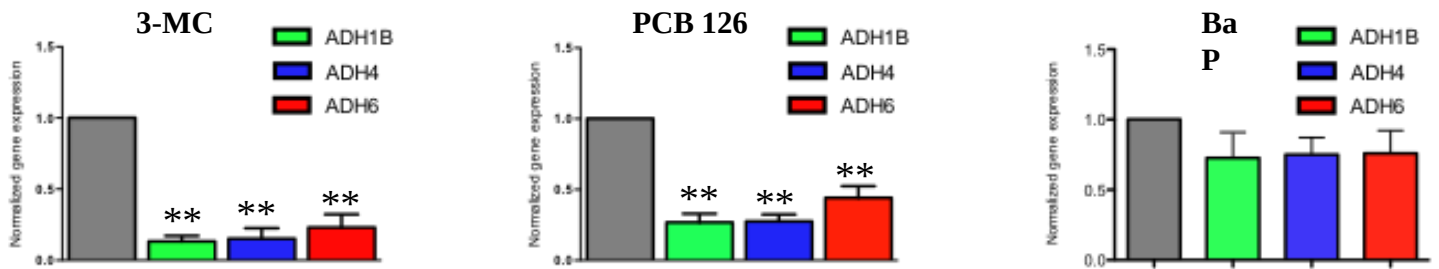


Figure 3 : Other ligands of AhR decrease the levels of ADH mRNA

Quantitative real-time PCR analysis of the levels of ADH (ADH1B, 4 and 6) mRNA levels after exposure of cells to 5 μ M 3-methylcholanthrene (3-MC), 1 μ M PCB 126 or 1 μ M BaP for 24h.

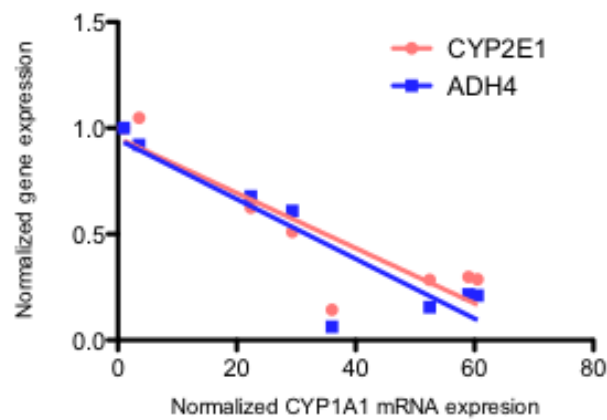


Figure 4: correlation of expression of ADH4, CYP2E1 and CYP1A1.

The normalized mRNA expressions of CYP2E1 (pink) and ADH4 (blue) after treatment with various concentrations of different agonists of AhR were plotted against the normalized mRNA expression of CYP1A1. The line represents the trendline.

		Contrôle	CH223191 1µM	CH223191 10µM	TCDD 3 nM	CH223191 1µM TCDD 3 nM	CH223191 10µM TCDD 3 nM	TCDD 25 nM	CH223191 1µM TCDD 25 nM	CH223191 10µM TCDD 25 nM
CYP1A1	1		0,08 ± 0,01	0,03 ± 0,01	53,5 ± 24,3	21,1 ± 10,8	4,4 ± 1,4	56,0 ± 12,8	38,14 ± 24,9	9,3 ± 11,5
CYP2E1	1		0,94 ± 0,16	0,96 ± 0,17	0,41 ± 0,11	0,73 ± 0,28	0,99 ± 0,44	0,28 ± 0,05	0,42 ± 0,16	0,74 ± 0,17
ADH1A	1		0,81 ± 0,5	0,96 ± 0,29	0,33 ± 0,15	0,80 ± 0,36	0,98 ± 0,84	0,25 ± 0,14	0,42 ± 0,17	0,93 ± 0,15
ADH1B	1		0,90 ± 0,16	0,94 ± 0,33	0,27 ± 0,19	0,87 ± 0,14	1,00 ± 0,54	0,39 ± 0,15	0,50 ± 0,14	0,76 ± 0,40
ADH4	1		0,77 ± 0,26	0,80 ± 0,27	0,33 ± 0,08	0,78 ± 0,19	0,83 ± 0,23	0,28 ± 0,05	0,70 ± 0,30	0,51 ± 0,14
ADH6	1		0,98 ± 0,13	1,07 ± 0,27	0,63 ± 0,10	1,03 ± 0,14	1,11 ± 0,11	0,53 ± 0,06	0,68 ± 0,11	0,79 ± 0,21

Table 3 : The inhibition of AhR by CH-223191, an antagonist, reverses the regulation of expression of ADH mRNA by TCDD.

The levels of ADH and CYP2E1 mRNA were measured by qRT-PCR after 24 hours of exposure of the cells to TCDD (3 or 25 nM) in the presence or absence of the AhR antagonist, CH-223191, at 1 or 10µM, added one hour before TCDD. Relative mRNA levels were calculated using the control value as the reference. The CYP 1A1 mRNA level was used as a control for AhR activation.

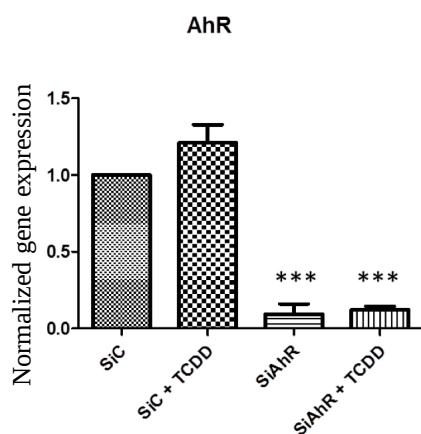


Figure 5 : Transfection by siAhR decreases AhR mRNA in HepaRG cells.

Levels of AhR mRNA were measured by qRT-PCR in differentiated HepaRG cells transfected with siRNA directed against AhR (siAhR) or scrambled (siC). The values are the means of four independent experiments. Four days after transfection the AhR expression is reduced by 85%. TCDD does not have any effect on basal AhR expression.

gène	siC + TCDD	siAhR	siAhR + TCDD	
CYP2E1	0,41 ± 0,09 *	1,05 ± 0,27	0,85 ± 0,29	#
ADH1A	0,36 ± 0,12	1,07 ± 0,13	0,84 ± 0,4	
ADH1B	0,45 ± 0,21	1,25 ± 0,35	1,17 ± 0,25	
ADH4	0,35 ± 0,08 **	1,04 ± 0,03	0,77 ± 0,17 ** ##	
ADH6	0,58 ± 0,08 *	1,07 ± 0,11	0,91 ± 0,18	#
ADH5	0,97 ± 0,04	0,99 ± 0,05	0,97 ± 0,07	
CYP1A1	255 ± 86 ***	0,29 ± 0,05 **	44,58 ± 19 ** #	

Table 4 : AhR mediates the decrease in expression of ADHs and CYP2E1 by TCDD.

ADHs, CYP2E1 and CYP1A1 mRNA levels were measured by qRT-PCR. Each column represents the fold expression of the gene (+/- SD) after TCDD treatment (25nM, 24h) compared to siC. The values are the means of four independent experiments. The * shows the significance compared to siC, the # show the significance compared to siC+TCDD.

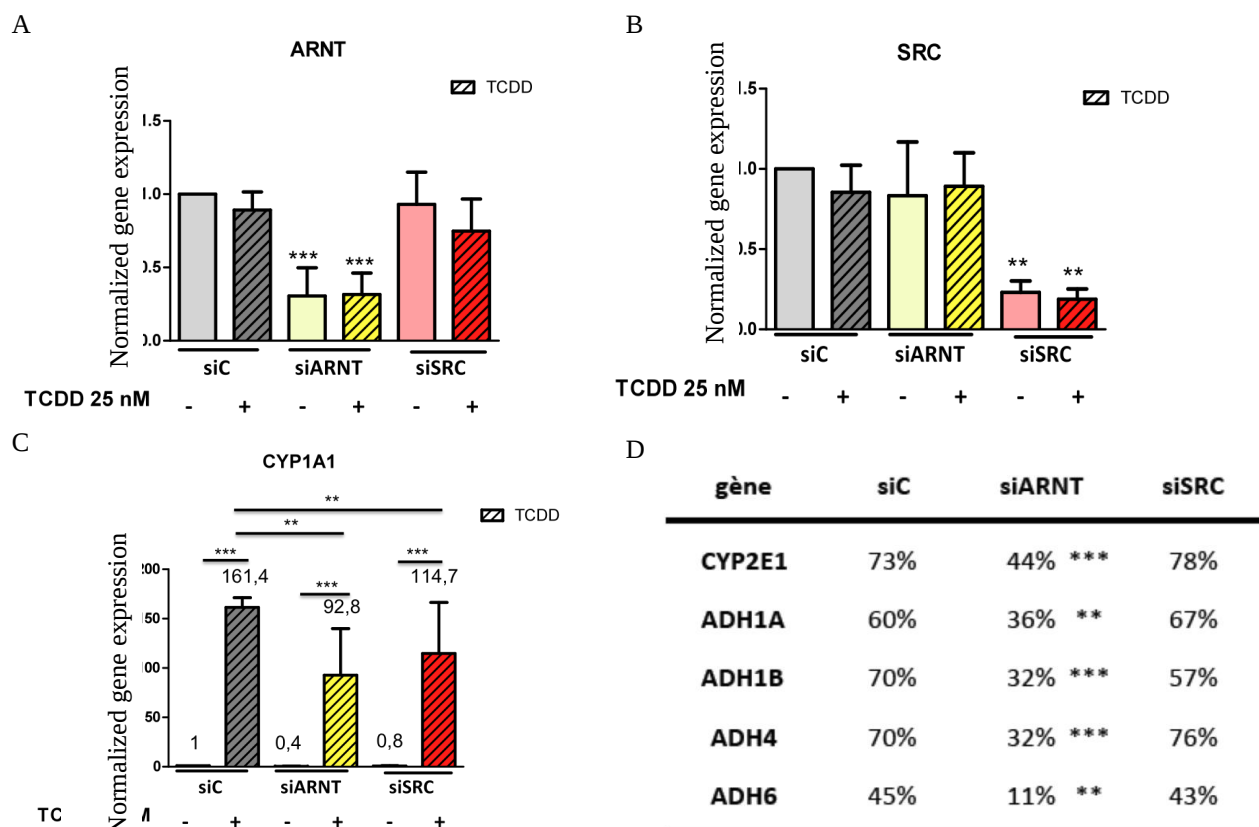


Figure 6 : TCDD regulates the expression of ADHs through the AhR genomic pathway.

A/B/C : Differentiated HepaRG cells were transfected with siRNA against ARNT or SRC or a scramble siRNA during seeding. The following day, the cells were treated or not with TCDD 25nM for 24h. The levels of ARNT (A), c-Src (B) and CYP1A1 mRNA were measured by qRT-PCR. Relative mRNA levels were calculated using siC value as the reference.

D : The levels of ADH mRNAs were measured by qRT-PCR. The inhibition of expression of mRNA after TCDD treatment (24h, 25nM) following transfection of HepaRG cells with specific or control siRNA are shown. Relative inhibitions were calculated using the respective control value as reference (non treated siC, siARNT or siSRC). The values are the means of five independent experiments. Without no other indication, * represents the statistical significance compared to siC.

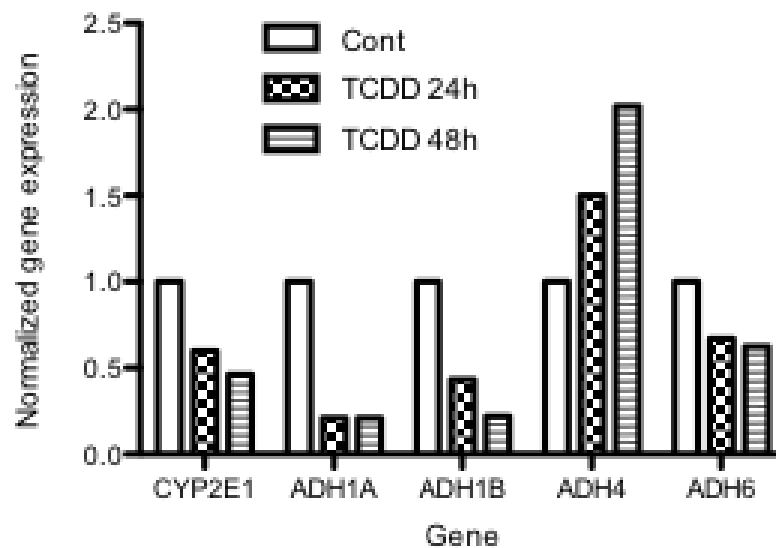


Figure 7 : Expression of ADHs and CYP2E1 is also regulated in human hepatocytes in primary culture.

Forty eight hours after seeding, human hepatocytes were treated or not with 25nM TCDD for 24 or 48 hours. qRT-PCR were performed to measure the expression of ADHs and CYP2E1. The TCDD decreased ADH and CYP2E1 expression (except for ADH4) at both time points.

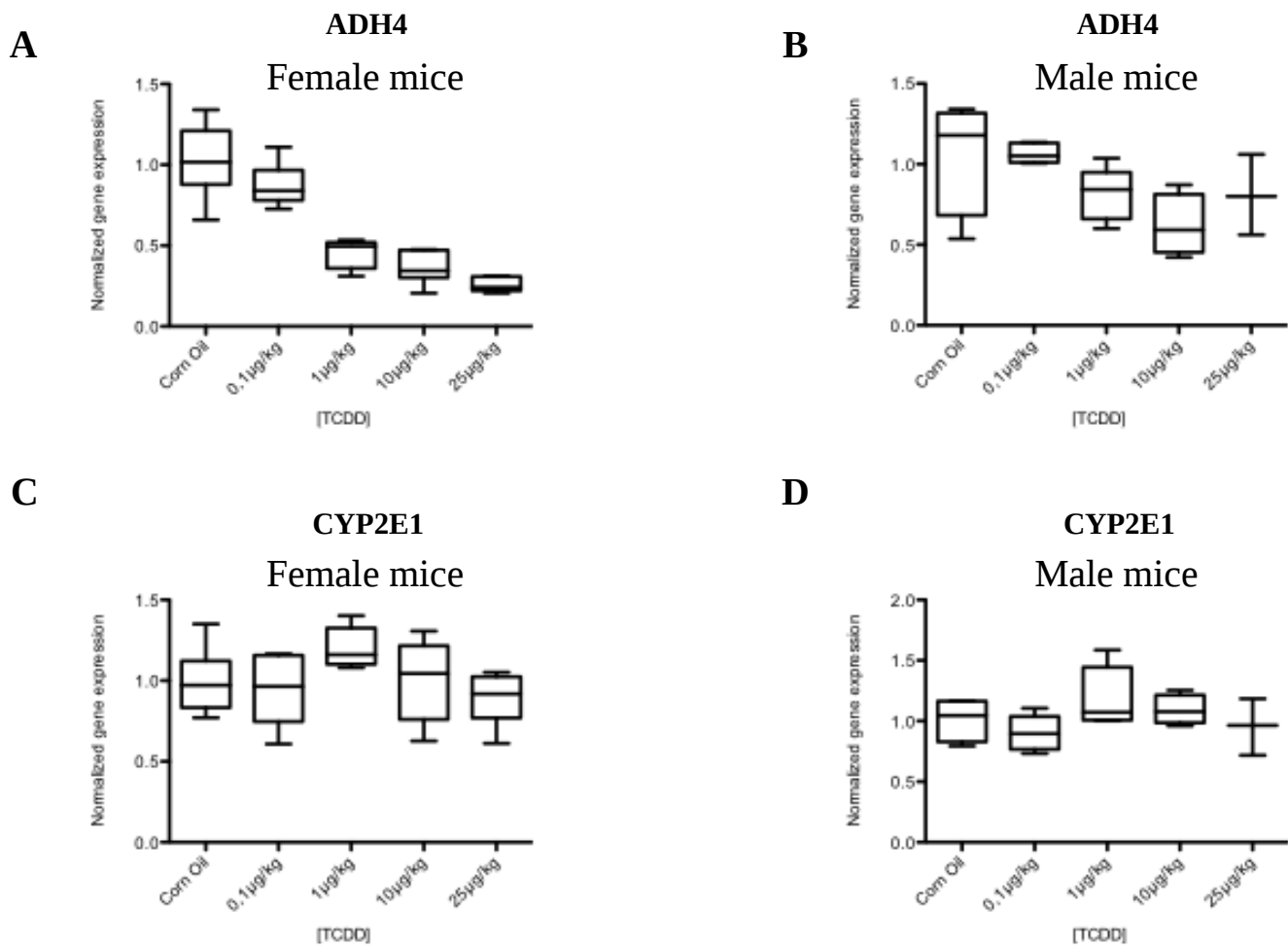


Fig 8 : ADH4 but not CYP2E1 is decrease in female and male mice treated with TCDD.

Mice received IP injections of TCDD (0, 0.1, 1, 10 and 25 μ g/kg bw or corn oil) once every week for 7 weeks as described in the methods. Hepatic mRNA expression was measured by qRT-PCR using GAPDH as reference. The expression of ADH4 and CYP2E1 mRNA in each treated group was compared to the mean expression of the same control group ($\Delta\Delta Ct$).

3.2.2 Conclusion

Dans cette étude, nous avons analysé les effets de la voie du AhR sur la régulation des ADHs dans les cellules HepaRG.

Nous avons observé une diminution des ARNm des ADH1, 4, 6 et du CYP2E1, après l'activation du AhR par la TCDD. Cette activation a été vérifiée par l'augmentation de l'ARNm du CYP1A1, une cible classique du AhR. Ces modifications d'expressions des ARNm dues à l'activation du AhR ont été retrouvées au niveau de la quantité de protéine par western blot. *In vivo*, chez la souris traitée par de faibles doses de TCDD pendant 7 semaines, seul l'ARNm de l'Adh4 est diminué aussi bien chez les mâles que chez les femelles, avec un effet plus important chez les femelles. Cette différence est peut-être due au fait que les mâles éliminent plus rapidement la TCDD grâce à la sécrétion de la MUP. Après 7 semaines, la diminution de l'expression de l'ARNm de l'Adh4 est significative dès $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ de TCDD. Elle diminue de 50% chez les femelles et de 30% chez les mâles. La dose de $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ chez la femelle entraîne une diminution de l'ARNm de l'Adh4 avec une p-value de 0,056 (figure 8 de l'article n°3). Les expressions des ARNm de l'Adh1 (non montré) et du Cyp2E1 ne sont pas modifiées par l'exposition aux différentes doses de TCDD, contrairement aux résultats trouvés dans la cellule HepaRG. Cela peut être expliqué par la différence entre les deux modèles. En effet, nous passons d'une lignée cellulaire humaine à un organisme entier, la souris. Il peut donc y avoir l'influence de l'espèce mais aussi du système intégré versus des cellules isolées.

La demi-vie des ARNm des ADHs en absence ou en présence de TCDD a été déterminée à l'aide de DRB dans les cellules HepaRG. La demi-vie des ARNm des ADHs est de 10 heures, elle n'est pas modifiée par le traitement à la TCDD (figure 2 de l'article n°3). Cela suggère que la régulation des ADHs par le AhR est soit transcriptionnelle soit régulée par un autre facteur comme nous l'avons déjà suggéré pour PGC1 α dans le chapitre 2. Différents ligands du AhR ont été utilisés et ont montré une forte corrélation entre l'augmentation de l'ARNm du CYP1A1 induite par l'activation du AhR par la TCDD, et la diminution des ARNm de l'ADH4 et du CYP2E1 (figure 3 de l'article n°3). Il est à noter que l'expression de l'ADH5, l'isoforme exprimée dans tous les tissus, n'est pas modifiée par la TCDD ou les autres ligands du AhR. Ces résultats suggèrent que la voie de signalisation du AhR, activée par la TCDD, est bien impliquée dans la régulation des ARNm des ADHs 1,4 et 6 et du CYP2E1, et cette hypothèse a été vérifiée en utilisant l'inhibiteur CH-223191 et un SiARN dirigé contre le AhR

(table 3 et table 4 de l'article n°3). En effet, dans ces deux expériences, nous avons perdu l'effet inhibiteur de la TCDD sur les ADHs. Les mêmes résultats ont été retrouvés au niveau protéique par western blot, après 72 heures de traitement. L'utilisation de SiARNT et SiSrc (figure 6) nous ont permis de conclure que la régulation des ADHs utilisait la voie génomique du AhR, en formant un complexe avec l'ARNT, et que la voie non génomique, via Src, n'était pas impliquée. Nous avons aussi observé que le SiARN dirigé contre l'ARNT augmentait le niveau basal des ARNm considérés, ce qui suggère que l'ARNT pourrait avoir un rôle dans le contrôle constitutif de l'expression des ADHs. Alternativement, le AhR pourrait être activé en absence de TCDD par des ligands endogènes, présents par exemple dans le sérum de veau fœtal.

Nos résultats sont en accord avec d'autres études publiées dans la littérature, bien que les doses de TCDD, les temps de traitements ainsi que les modèles utilisés soient différents [[Forgacs et al., 2013](#)] [[Fletcher et al., 2005](#)].

Les ADHs métabolisent aussi le rétinol (aussi connu sous le nom de vitamine A), en rétinaldéhyde, lors de la production d'acide rétinoïque. Elles protègent ainsi l'organisme d'une intoxication à la vitamine A. De plus, des souris KO vis à vis des ADH montrent des dysfonctionnement du métabolisme des rétinoïdes [[Kumar et al., 2012](#)]. Il sera donc intéressant d'étudier les effets de l'activation du AhR sur ce métabolisme.

Conclusion et perspectives

Le développement industriel massif du 20ème siècle a entraîné une production en très grande quantité de nombreuses molécules, dont on ne connaît l'impact sanitaire ni sur l'Homme, ni sur l'environnement et l'écosystème. Dès le début de cette exposition massive, des scientifiques, comme Rachel Carson en 1962, ont tiré la sonnette d'alarme par la mise en évidence d'effets toxiques, comme l'amincissement de la coquille des œufs de rapaces induite par l'insecticide DDT. Pourtant, il a fallu attendre la fin des années 1990 avec la mise en place du protocole d'Arrhus, suivi de la convention de Stockholm pour que des mesures soient prises afin de protéger les populations des molécules les plus dangereuses. Enfin, en 2006, la directive REACH a été votée par l'Union Européenne, obligeant les industriels à démontrer que les molécules qu'ils fabriquent et mettent sur le marché, sont inoffensives pour l'Homme et les écosystèmes. Mais cette directive considère l'effet toxique des molécules de manière individuelle, les effets des mélanges de molécules ne sont donc pas du tout évalués. Or, l'Homme est exposé à des mélanges complexes de xénobiotiques, en général à faibles doses et tout au long de sa vie. La majorité des études portant sur les effets des mélanges, étudie des molécules agissant sur une même voie de signalisation, les recherches menées sur les mélanges des perturbateurs endocriniens en sont les parfaits exemples. Mais ces études ne reflètent pas la réalité des mélanges auxquels l'Homme est exposé, car elles ne considèrent qu'une classe de polluant. Quelques exemples d'étude de molécules agissant par des voies de signalisation différentes existent, mais sans étude systématique sur de nombreux marqueurs [Couvoul et al., 2001] [Merhi et al., 2010]. De nos jours, les chercheurs essaient d'évaluer les effets des mélanges complexes afin de pouvoir prédire, à terme, leur toxicité. La Communauté Européenne est d'ailleurs préoccupée par les effets de ces expositions multiples et à faibles doses, puisqu'elle finance des programmes pluridisciplinaires depuis plusieurs années. Dernièrement, fin 2013, dans ce cadre, le projet HEALS sur l'exposome chez l'homme a été engagé : il va de l'analyse de l'exposition externe à celle de l'exposition

interne et des conséquences sur diverses pathologies, allergie et asthme, neurodéveloppement et neurodégénération et enfin obésité et diabète. Ce travail, qui implique la création d'une cohorte de jumeaux et l'étude de cohortes existantes mais aussi la modélisation des expositions et de leurs conséquences, a pour but de faire, à terme, des recommandations à la Communauté Européenne sur la politique à suivre pour diminuer l'impact de la pollution au sens large sur la santé des européens.

Mon travail de thèse s'est inscrit dans cette démarche d'étude des conséquences de l'exposition à des multiples polluants combinés et a consisté à évaluer les effets d'un mélange simple (TCDD/ α -endosulfan), dans le but de comprendre son action au niveau cellulaire et d'extrapoler au mieux les résultats obtenus aux conséquences sanitaires potentielles qu'il pourrait engendrer chez l'Homme.

Étant donné le nombre de molécules chimiques à évaluer, analyser les effets de tous les mélanges potentiels serait un travail énorme et quasi impossible, devant s'étaler sur plusieurs années et utilisant de nombreux modèles différents. Le corps humain ne possède que quelques récepteurs qui peuvent être activés par ces xénobiotiques, certains xénosenseurs pour favoriser leur élimination par la régulation des enzymes du métabolisme des xénobiotiques, comme le PXR, le CAR ou le AhR et même certains récepteurs hormonaux, comme ER, le AR ("Androgen Receptor"), le récepteur à l'hormone thyroïdienne ou le PPAR, qui se trouvent activés par certaines molécules qui agissent alors comme perturbateurs endocriniens et entraînent ainsi des pathologies variées. Nous avons donc utilisé des ligands spécifiques de plusieurs voies de signalisation distinctes et étudié ainsi les effets de la co-activation de ces voies par les xénobiotiques modèles choisis.

L' α -endosulfan a été utilisé car il est décrit pour activer la voie du PXR et celle du ER. Bien que ce pesticide ne soit plus utilisé en France depuis 2007, nous y sommes toujours exposés. En effet, il est défini comme polluant organique persistant et est donc toujours présent dans l'environnement. De plus, la mondialisation entraîne l'exportation de denrées alimentaires contaminées, par des pays où son utilisation est toujours actuelle et peu contrôlée, comme l'Inde ou la Chine. Nous avons utilisé un autre POP, une dioxine, la TCDD qui est produite au cours de combustions incomplètes mais aussi lors de la fabrication de pesticides organochlorés comme l'endosulfan. La TCDD est bien décrite dans la littérature pour activer le AhR. Mon travail de thèse s'est donc inscrit dans une démarche de caractérisation des interactions entre ces voies de signalisation pour appréhender les effets de mélanges contenant à la fois des ligands du AhR,

du ER et/ou du PXR.

La première étude est une étude globale de l'effet du mélange sur le transcriptome (puces Affymétrie) de cellules HepaRG après le co-traitement par les deux molécules modèles. Nous avons montré que certains gènes étaient régulés plus fortement par le mélange que par les polluants seuls (pour un niveau de modification de l'expression de deux fois ou plus par rapport à la condition contrôle). Ces dérégulations ont aussi été retrouvées au niveau des quantités de protéines pour certains gènes clés du métabolisme de l'alcool, comme l'ADH1 ou le CYP2E1.

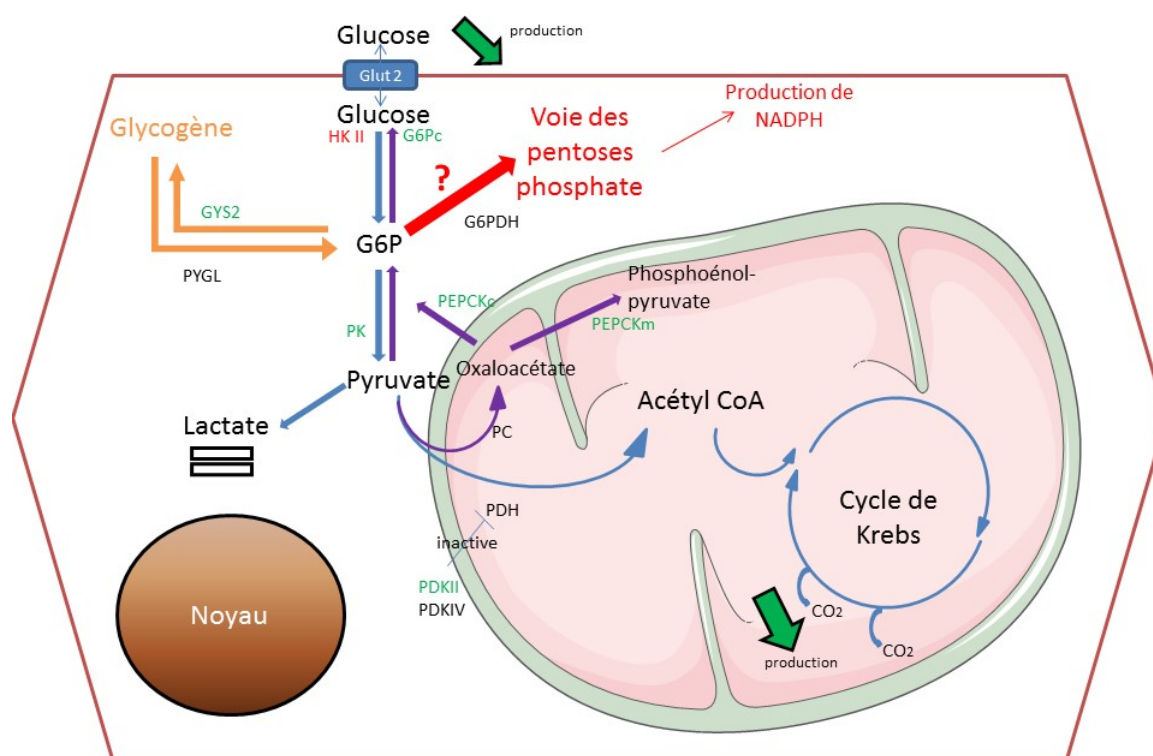
Dans le but de déterminer des processus cellulaires potentiellement impactés par le mélange de polluants, le logiciel Ingenuity a été utilisé afin d'identifier les catégories de gènes les plus dérégulées par le mélange. Les principales fonctions régulées (et dans le cas présent, inhibées) par le mélange sont celles du métabolisme énergétique et en particulier le métabolisme glucidique. Nous nous sommes donc plus particulièrement intéressés aux modifications de ce métabolisme par les polluants en mélange, dans la seconde étude, puisqu'il n'y avait aucune donnée dans la littérature à ce sujet.

Dans cette seconde étude, nous avons analysé les effets des polluants seuls ou en mélange sur le métabolisme énergétique des cellules HepaRG. Nous avons obtenu les mêmes modifications d'expression des ARNm par RT-qPCR que celles observées par l'étude du transcriptome. Des expériences de mesure de flux métaboliques ont montré que les modifications d'expressions des gènes avaient des conséquences au niveau du fonctionnement de la cellule. Nous avons, par ailleurs, montré que les mêmes effets des polluants étaient retrouvés en condition glycolytique (milieu contenant 2 g l^{-1} de glucose) ou en condition néoglucogénique (milieu sans glucose contenant des substrats néoglucogéniques). Les POPs peuvent donc modifier l'expression des gènes des cellules de manière indépendante de la concentration en glucose du milieu de culture, dans le système modèle HepaRG, et nous posons donc l'hypothèse que des perturbations du métabolisme énergétique du foie, pourraient être observées quelle que soit la condition physiologique de l'organisme exposé (état nourri ou à jeun). Si les résultats observés dans la cellule hépatocytaire HepaRG étaient généralisés à l'organisme entier, cela pourrait avoir un impact sur tout l'organisme car le foie est l'organe principal, avec le pancréas, de régulation de la glycémie.

Au-delà de cette étude fonctionnelle de l'effet des polluants sur les flux glucidiques, notre but était aussi de se rapprocher le plus possible d'une exposition chronique (correspondant à celle de l'Homme) ; nous avons donc diminué les doses de polluants et traité les cellules HepaRG

pendant huit jours à la TCDD avec des doses diminuées de 5 à 125 fois, et l' α -endosulfan diminué de 10 fois. Bien que ces doses soient très faibles, elles restent plus élevées que pour l'exposition réelle de l'Homme ; en effet, des études d'expologie menées chez l'Homme, ont caractérisé des concentrations plasmatiques de 20 nM d'endosulfan et de 30 nM de ces métabolites. Le président Yushchenko, qui a subi une intoxication aiguë de TCDD, avait environ 0.2 nM de TCDD dans le sang, environ 6000 fois plus que la concentration sanguine de la population générale (0.3pM), cette concentration impliquait une dose excédant $25 \mu\text{g kg}^{-1}$. Des diminutions importantes des expressions des ARNm ont été observées avec les doses les plus faibles des POPs, et pour certains mélanges, nous obtenons des diminutions plus importantes que celles observées avec les polluants seuls. Nous en concluons qu'une exposition à des doses plus faibles pendant un temps de traitement plus long, pourrait avoir les mêmes effets que ceux observés avec un protocole plus classique. Ces effets à faibles doses pourraient être en partie liés à la nature chimique des xénobiotiques utilisés qui, en tant que POPs, ne se distribuent probablement pas de manière uniforme dans la cellule et pourraient se concentrer au niveau de certains compartiments, activant ainsi les récepteurs. D'autre part, la nature hydrophobe des molécules peut aussi entraîner une liaison au plastique des récipients de culture puis un relargage éventuel des composés testés. Nous avons minimisé ce phénomène en ne changeant le milieu de culture que deux fois au cours des huit jours de traitement.

Par la suite, il sera intéressant d'étudier les effets des POPs sur la voie des pentoses phosphate, car nous avons observé une diminution des flux glycolytique et néoglucogénique, sans modification de la quantité de lactate, accompagnée d'une augmentation du niveau de l'ARNm de l'hexokinase 2. Or, cette enzyme catalysant la première de la glycolyse, séquestre le glucose dans les cellules hépatiques en le phosphorylant en glucose-6-phosphate (G6P). L'expression de l'enzyme capable de le déphosphoryler et donc de permettre son transport hors de la cellule, la G6Pc, étant fortement diminuée ainsi que le flux glycolytique global, nous posons l'hypothèse que les concentrations de G6P devraient augmenter dans la cellule et conduire à son incorporation dans la voie des pentoses phosphate. La voie des pentoses phosphate entraîne la production de NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) qui permet les réactions d'anabolisme, comme la synthèse des lipides et protège la cellule du stress oxydant. En effet, le NADPH est un cofacteur essentiel à la production de glutathion réduit qui a un effet anti-oxydant (figure n°26). En effet, la TCDD, chez le rat [Bentli et al., 2013], et chez l'Homme [Ilavarasi et al., 2011], et l'endosulfan, chez la souris [Canlet et al., 2013] et chez



Voie du glycogène, Glycolyse, Néoglucogénèse

Régulation de l'expression des ARNm par le mélange: Diminution, Augmentation, Stationnaire

FIGURE 26 – Schéma récapitulatif de régulations induites par les polluants et hypothèse de la voie des pentoses phosphate.

Les flux glycolytique et néoglucogénique sont diminués, accompagnés d'une augmentation de l'hexokinase 2, entraînant la production de G6P, et la diminution de G6Pc qui dégrade le G6P, nous permettent de poser l'hypothèse que la cellule redirige le G6P produit vers la voie des pentoses phosphate, en augmentant la concentration du NADPH et de lutter ainsi contre le stress oxydant.

l'Homme [Sohn et al., 2004], entraînent un stress oxydant.

Il serait intéressant d'effectuer les mêmes expériences sur des cellules hépatiques primaires humaines afin de vérifier nos résultats, malgré les variations inter-individuelles des préparations. Cependant, les études à long terme ne pourraient être réalisées, puisque les cellules hépatiques primaires ne sont utilisables en culture que pendant quelques jours.

L'articulation des voies du métabolisme des glucides avec la voie des lipides reste aussi à éclaircir. Nos expériences préliminaires semblent montrer une augmentation de la quantité de gouttelettes lipidiques dans les cellules HepaRG par l' α -endosulfan, une possible diminution, inattendue, par la TCDD, et une quantité proche de celle de la condition contrôle par le mélange. Il faut poursuivre l'analyse afin de comprendre l'impact des POPs sur le métabolisme lipidique. L'étude est cependant perturbée par la présence d'une double population cellulaire

(types hépatocyttaire et biliaire) qui rend les quantifications plus compliquées.

Afin d'effectuer des expériences *in vivo* représentatives pour l'Homme, il faut trouver un modèle alternatif avec lequel nous pourrions valider les résultats. Parce que le modèle souris est très utilisé et qu'il existe des animaux invalidés pour différents gènes, comme le AhR, nous avons choisi le modèle de la souris C57Bl/6J. Les premières études réalisées chez la souris sont encourageantes : en effet, nous avons retrouvé des diminutions de certains ARNm après un traitement "semi-chronique" avec de très faibles doses de TCDD. Cependant, des différences existent entre l'Homme et les rongeurs, qui sont les modèles les plus employés. Par exemple, la sensibilité des récepteurs, AhR et PXR, aux différents ligands varient entre les espèces et, chez une même espèce, en fonction de la lignée. Il est connu que le traitement par la TCDD chez la souris entraîne une stéatose hépatique, c'est à dire une accumulation de gouttelettes lipidiques dans le foie, ce qui est l'inverse du résultat que nous avons obtenu dans les cellules HepaRG. Mis à part le fait que nous comparons deux espèces différentes, la différence d'effet de la TCDD peut aussi s'expliquer par le fait que les souris sont un système intégré par rapport aux cellules HepaRG. Les doses que nous avons utilisées, sont élevées par rapport à l'exposition réelle de l'Homme. En effet, il a été montré que le foie de personnes non fumeuses contenait 2.9 pg TEQ/gr de tissu [Arisawa et al., 2005]; chez la souris, cette concentration est atteinte par des injections de 5 à 50 ng/kg/jour de TCDD pendant 18 jours [Sato et al., 2008]. Cependant, une comparaison entre les modèles souris, rat et des hépatocytes humains a conclu que la souris était un meilleur modèle que le rat pour l'Homme avec le développement d'une stéatose après une exposition à la TCDD chez la souris et dans les hépatocytes humains mais pas chez le rat [Forgacs et al., 2013]. Le fait que les cellules HepaRG soient issues d'un hépatocarcinome pourrait aussi expliquer la différence avec les hépatocytes primaires humains.

Dans la troisième étude, nous avons étudié l'effet des agonistes du AhR sur la régulation des enzymes du métabolisme de l'alcool. La TCDD (25nM) diminue l'expression des ARNm et des protéines des alcool déshydrogénases (ADH1, 4, 6) et du CYP2E1, après respectivement 30 et 72h de traitement. Les traitements avec des doses beaucoup plus faibles et un temps de traitement d'une semaine ont aussi entraîné des diminutions importantes de l'expression de ces mêmes ARNm. Ainsi, comme dans l'étude précédente, on peut penser que des doses plus faibles sur un temps encore plus long, pourraient mimer en partie une exposition "semi-chronique". Les conséquences d'une diminution de l'expression des ADH sur les fonctions cellulaires restent à étudier. D'une part, on pourrait faire l'hypothèse qu'une exposition à un agoniste du

AhR, préviendrait, en théorie, les effets toxiques de l'alcool sur le foie en diminuant son métabolisme oxydatif. En effet, la diminution des enzymes du métabolisme de l'alcool entraînerait moins de transformation de l'alcool en acétaldéhyde puis en acétate. Potentiellement, il y aurait moins d'acétyl CoA, et donc moins d'accumulation de lipides. De plus, l'augmentation du rapport $NADH, H^+/NAD^+$ serait limité, ce qui permettra de conserver un métabolisme hépatique "normal". Mais si le foie pourrait être "protégé" dans ces conditions où il n'y a pas de métabolisation, les autres organes, et notamment le système nerveux central, seraient alors exposés à une concentration plus importante d'alcool. Par ailleurs, l'éthanol serait disponible pour former des FAEE (Ethyl Ester d'acide gras), molécules connues pour leurs effets toxiques sur divers organes. Ainsi, l'exposition aux agonistes du AhR empêcherait le foie d'agir de manière protectrice pour l'organisme. De plus, certaines ADHs sont aussi impliquées dans le métabolisme des rétinoïdes. La diminution de leurs expressions pourrait conduire à un déficit en acide rétinoïque, un second messenger cellulaire, impliqué dans divers processus biologiques (développement, différenciation, prolifération, ou apoptose). L'impact de l'effet des agonistes du AhR sur ce métabolisme devra donc être étudié afin de déterminer son rôle potentiel dans l'apparition des pathologies hépatiques.

Il existe encore très peu d'études *in vitro* portant sur les effets des mélanges de polluants appartenant à des familles différentes et dont les modes d'action sont variés, et encore moins sur des effets à doses faibles. Tous nos résultats montrent que les deux POPs modèles que nous avons testés pourraient entraîner des perturbations du métabolisme intermédiaire au niveau hépatique, chez l'Homme même s'il est impossible d'extrapoler les résultats que nous avons obtenus sur un système cellulaire aux perturbations suspectées (par les études épidémiologiques) après exposition à des mélanges de polluants, comme des maladies métaboliques. Les résultats obtenus confortent l'utilité de telles études de mélanges dans des systèmes *in vitro*, tout en y associant des modèles animaux, sans oublier la modélisation à travers les modèles pharmacologiques cinétiques (PBPK pour Physiological Based Pharmacokinetic) comme outils complémentaires.

Bibliographie

- [Abel and Haarmann-Stemmann, 2010] Abel, J. and Haarmann-Stemmann, T. (2010). An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Biological Chemistry*, 391(11) :1235–1248.
- [Alonso-Magdalena et al., 2010a] Alonso-Magdalena, P., Ropero, A. B., Soriano, S., Quesada, I., and Nadal, A. (2010a). Bisphenol-a : a new diabetogenic factor ? *Hormones (Athens, Greece)*, 9(2) :118–126.
- [Alonso-Magdalena et al., 2010b] Alonso-Magdalena, P., Vieira, E., Soriano, S., Menes, L., Burks, D., Quesada, I., and Nadal, A. (2010b). Bisphenol a exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environmental Health Perspectives*, 118(9) :1243–1250.
- [Alsharif et al., 1994] Alsharif, N. Z., Schlueter, W. J., and Stohs, S. J. (1994). Stimulation of NADPH-dependent reactive oxygen species formation and DNA damage by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rat peritoneal lavage cells. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 26(3) :392–397.
- [Alva et al., 2012] Alva, S., Damodar, D., D’Souza, A., and D’Souza, U. J. A. (2012). Endosulfan induced early pathological changes in vital organs of rat : a biochemical approach. *Indian Journal of Pharmacology*, 44(4) :512–515.
- [Ambolet-Camoit et al., 2010] Ambolet-Camoit, A., Bui, L. C., Pierre, S., Chevallier, A., Marchand, A., Coumoul, X., Garlatti, M., Andreau, K., Barouki, R., and Aggerbeck, M. (2010). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin counteracts the p53 response to a genotoxicant by upregulating expression of the metastasis marker *agr2* in the hepatocarcinoma cell line HepG2. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 115(2) :501–512.
- [Andersson et al., 2012] Andersson, T. B., Kanebratt, K. P., and Kenna, J. G. (2012). The HepaRG cell line : a unique in vitro tool for understanding drug metabolism and toxicology in human. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*.
- [Angrish et al., 2012a] Angrish, M. M., Dominici, C. Y., and Zacharewski, T. R. (2012a). TCDD-elicited effects on liver, serum, and adipose lipid composition in c57bl/6 mice. *Toxicological Sciences*.
- [Angrish et al., 2012b] Angrish, M. M., Mets, B. D., Jones, A. D., and Zacharewski, T. R. (2012b). Dietary fat is a lipid source in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)-elicited hepatic steatosis in c57bl/6 mice. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 128(2) :377–386.
- [Anthérieu et al., 2012] Anthérieu, S., Chesné, C., Li, R., Guguen-Guillouzo, C., and Guillouzo, A. (2012). Optimization of the HepaRG cell model for drug metabolism and toxicity studies. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 26(8) :1278–1285.
- [Anthérieu et al., 2011] Anthérieu, S., Rogue, A., Fromenty, B., Guillouzo, A., and Robin, M.-A. (2011). Induction of vesicular steatosis by amiodarone and tetracycline is associated with

-
- up-regulation of lipogenic genes in HepaRG cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 53(6) :1895–1905.
- [Arisawa et al., 2005] Arisawa, K., Takeda, H., and Mikasa, H. (2005). Background exposure to PCDDs/PCDFs/PCBs and its potential health effects : a review of epidemiologic studies. *The journal of medical investigation : JMI*, 52(1-2) :10–21.
- [Ayres and Ayres, 1996] Ayres, R. U. and Ayres, L. (1996). The life-cycle of chlorine : Part III and IV | INSEAD research.
- [Balkau et al., 2003] Balkau, B., Vernay, M., Mhamdi, L., Novak, M., Arondel, D., Vol, S., Tichet, J., Eschwège, E., and D.E.S.I.R. Study Group (2003). The incidence and persistence of the NCEP (national cholesterol education program) metabolic syndrome. the french d.e.s.i.r. study. *Diabetes & Metabolism*, 29(5) :526–532.
- [Barouki et al., 2007] Barouki, R., Coumoul, X., and Fernandez-Salguero, P. M. (2007). The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Letters*, 581(19) :3608–3615.
- [Bentli et al., 2013] Bentli, R., Ciftci, O., Cetin, A., and Otlu, A. (2013). Montelukast, an anti-inflammatory agent, can prevent toxic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in terms of oxidative stress and histological alterations in liver and serum cytokine levels. *Toxicology and Industrial Health*.
- [Bertazzi et al., 1998] Bertazzi, P. A., Bernucci, I., Brambilla, G., Consonni, D., and Pesatori, A. C. (1998). The seveso studies on early and long-term effects of dioxin exposure : a review. *Environmental health perspectives*, 106 Suppl 2 :625–633.
- [Bertazzi et al., 2001] Bertazzi, P. A., Consonni, D., Bachetti, S., Rubagotti, M., Baccarelli, A., Zocchetti, C., and Pesatori, A. C. (2001). Health effects of dioxin exposure : A 20-year mortality study. *American Journal of Epidemiology*, 153(11) :1031–1044.
- [Bliss, 1939] Bliss, C. I. (1939). The toxicity of poisons applied jointly1. *Annals of Applied Biology*, 26(3) :585–615.
- [Briz et al., 2011] Briz, V., Molina-Molina, J.-M., Sánchez-Redondo, S., Fernández, M. F., Grimalt, J. O., Olea, N., Rodríguez-Farré, E., and Suñol, C. (2011). Differential estrogenic effects of the persistent organochlorine pesticides dieldrin, endosulfan, and lindane in primary neuronal cultures. *Toxicological Sciences*, 120(2) :413–427.
- [Bunone et al., 1996] Bunone, G., Briand, P. A., Miksicek, R. J., and Picard, D. (1996). Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *The EMBO Journal*, 15(9) :2174.
- [Camacho et al., 2005] Camacho, I. A., Singh, N., Hegde, V. L., Nagarkatti, M., and Nagarkatti, P. S. (2005). Treatment of mice with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin leads to aryl hydrocarbon receptor-dependent nuclear translocation of NF- κ b and expression of fas ligand in thymic stromal cells and consequent apoptosis in t cells. *The Journal of Immunology*, 175(1) :90–103.
- [Canlet et al., 2013] Canlet, C., cile, Tremblay-Franco, M., Gautier, R., Molina, J., rô, me, Mé, Tais, B., Blas-Y Estrada, F., and Gamet-Payraastre, L. (2013). Specific metabolic fingerprint of a dietary exposure to a very low dose of endosulfan. *Journal of Toxicology*, 2013 :e545802.
- [Casabar et al., 2006] Casabar, R. C. T., Wallace, A. D., Hodgson, E., and Rose, R. L. (2006). Metabolism of endosulfan- α by human liver microsomes and its utility as a simultaneous in vitro probe for CYP2b6 and CYP3a4. *Drug Metabolism and Disposition*, 34(10) :1779–1785.
-

-
- [Cengiz et al., 2001] Cengiz, E. I., Unlü, E., and Balci, K. (2001). The histopathological effects of thiodan on the liver and gut of mosquitofish, *gambusia affinis*. *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes*, 36(1) :75–85.
- [Cerec et al., 2007] Cerec, V., Glaise, D., Garnier, D., Morosan, S., Turlin, B., Drenou, B., Gripon, P., Kremsdorf, D., Guguen-Guillouzo, C., and Corlu, A. (2007). Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 45(4) :957–967.
- [Chang et al., 2010] Chang, J. W., Ou, H. Y., Chen, H. L., Guo, H. R., Liao, P. C., and Lee, C. C. (2010). Interrelationship between exposure to PCDD/fs and hypertension in metabolic syndrome in taiwanese living near a highly contaminated area. *Chemosphere*, 81(8) :1027–1032.
- [Chevallier et al., 2013] Chevallier, A., Mialot, A., Petit, J.-M., Fernandez-Salguero, P., Barouki, R., Coumoul, X., and Beranek, M. (2013). Oculomotor deficits in aryl hydrocarbon receptor null mouse. *PloS one*, 8(1) :e53520.
- [Clegg, 2012] Clegg, D. J. (2012). Minireview : the year in review of estrogen regulation of metabolism. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 26(12) :1957–1960.
- [Cohen et al., 2011] Cohen, J. C., Horton, J. D., and Hobbs, H. H. (2011). Human fatty liver disease : old questions and new insights. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6037) :1519–1523.
- [Coumoul et al., 2002] Coumoul, X., Diry, M., and Barouki, R. (2002). PXR-dependent induction of human CYP3a4 gene expression by organochlorine pesticides. *Biochemical Pharmacology*, 64(10) :1513–1519.
- [Coumoul et al., 2001] Coumoul, X., Diry, M., Robillot, C., and Barouki, R. (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 Research*, 61(10) :3942–3948.
- [Couse and Korach, 1999] Couse, J. F. and Korach, K. S. (1999). Estrogen receptor null mice : What have we learned and where will they lead us? *Endocrine Reviews*, 20(3) :358–417.
- [Diani-Moore et al., 2010] Diani-Moore, S., Ram, P., Li, X., Mondal, P., Youn, D. Y., Sauve, A. A., and Rifkind, A. B. (2010). Identification of the aryl hydrocarbon receptor target gene TiPARP as a mediator of suppression of hepatic gluconeogenesis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and of nicotinamide as a corrective agent for this effect. *Journal of Biological Chemistry*, 285(50) :38801–38810.
- [Dolwick et al., 1993] Dolwick, K. M., Swanson, H. I., and Bradfield, C. A. (1993). In vitro analysis of ah receptor domains involved in ligand-activated DNA recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(18) :8566–8570.
- [Dragin et al., 2006] Dragin, N., Dalton, T. P., Miller, M. L., Shertzer, H. G., and Nebert, D. W. (2006). For dioxin-induced birth defects, mouse or human CYP1a2 in maternal liver protects whereas mouse CYP1a1 and CYP1b1 are inconsequential. *The Journal of biological chemistry*, 281(27) :18591–18600.
- [Eyer et al., 2004] Eyer, F., Felgenhauer, N., Jetzinger, E., Pfab, R., and Zilker, T. R. (2004). Acute endosulfan poisoning with cerebral edema and cardiac failure. *Journal of toxicology. Clinical toxicology*, 42(6) :927–932.
- [Fernandez-Salguero et al., 1995] Fernandez-Salguero, P., Pineau, T., Hilbert, D. M., McPhail, T., Lee, S. S., Kimura, S., Nebert, D. W., Rudikoff, S., Ward, J. M., and Gonzalez, F. J.
-

-
- (1995). Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding ah receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 268(5211) :722–726.
- [Fletcher et al., 2005] Fletcher, N., Wahlström, D., Lundberg, R., Nilsson, C. B., Nilsson, K. C., Stockling, K., Hellmold, H., and Håkansson, H. (2005). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters the mRNA expression of critical genes associated with cholesterol metabolism, bile acid biosynthesis, and bile transport in rat liver : a microarray study. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207(1) :1–24.
- [Forgacs et al., 2013] Forgacs, A. L., Dere, E., Angrish, M. M., and Zacharewski, T. R. (2013). Comparative analysis of temporal and dose-dependent TCDD-elicited gene expression in human, mouse and rat primary hepatocytes. *Toxicological Sciences*.
- [Forgacs et al., 2012] Forgacs, A. L., Kent, M. N., Makley, M. K., Mets, B., DelRaso, N., Jahns, G. L., Burgoon, L. D., Zacharewski, T. R., and Reo, N. V. (2012). Comparative metabolomic and genomic analyses of TCDD-elicited metabolic disruption in mouse and rat liver. *Toxicological Sciences*, 125(1) :41–55.
- [Frasor et al., 2003] Frasor, J., Barnett, D. H., Danes, J. M., Hess, R., Parlow, A. F., and Katzenellenbogen, B. S. (2003). Response-specific and ligand dose-dependent modulation of estrogen receptor (ER) α activity by ER β in the uterus. *Endocrinology*, 144(7) :3159–3166.
- [Froissart et al., 2011] Froissart, R., Piraud, M., Boudjemline, A. M., Vianey-Saban, C., Petit, F., Hubert-Buron, A., Eberschweiler, P. T., Gajdos, V., and Labrune, P. (2011). Glucose-6-phosphatase deficiency. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 6 :27.
- [Frumkin, 2003] Frumkin, H. (2003). Agent orange and cancer : An overview for clinicians. *CA : A Cancer Journal for Clinicians*, 53(4) :245–255.
- [Fukunaga et al., 1995] Fukunaga, B. N., Probst, M. R., Reisz-Porszasz, S., and Hankinson, O. (1995). Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 270(49) :29270–29278.
- [Gill et al., 1991] Gill, T. S., Pande, J., and Tewari, H. (1991). Effects of endosulfan on the blood and organ chemistry of freshwater fish, barbus conchonus hamilton. *Ecotoxicology and environmental safety*, 21(1) :80–91.
- [Glover et al., 2007] Glover, C. N., Petri, D., Tollefsen, K.-E., Jørum, N., Handy, R. D., and Berntssen, M. H. G. (2007). Assessing the sensitivity of atlantic salmon (*salmo salar*) to dietary endosulfan exposure using tissue biochemistry and histology. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 84(3) :346–355.
- [Goasduff et al., 1995] Goasduff, T., Menez, J. F., Dreano, Y., and Berthou, F. (1995). CYP1a2 and 2e1 expression in rat liver treated with combined inducers (3-methylcholanthrene and ethanol). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 211(2) :497–503.
- [Goebel et al., 1982] Goebel, H., Gorbach, S., Knauf, W., Rimpau, R. H., and Hüttenbach, H. (1982). Properties, effects, residues, and analytics of the insecticide endosulfan. *Residue reviews*, 83 :1–174.
- [Gong et al., 2011] Gong, L., Cui, Z., Chen, P., Han, H., Peng, J., and Leng, X. (2011). Reduced survival of patients with hepatocellular carcinoma expressing hexokinase II. *Medical Oncology*, 29(2) :909–914.
- [Gooren and Toorians, 2003] Gooren, L. J. G. and Toorians, A. W. F. T. (2003). Significance of oestrogens in male (patho)physiology. *Annales d’endocrinologie*, 64(2) :126–135.
-

-
- [Grassman et al., 1998] Grassman, J. A., Masten, S. A., Walker, N. J., and Lucier, G. W. (1998). Animal models of human response to dioxins. *Environmental health perspectives*, 106 Suppl 2 :761–775.
- [Greene et al., 2003] Greene, J., Hays, S., and Paustenbach, D. (2003). Basis for a proposed reference dose (RfD) for dioxin of 1-10 PG/KG-day : A weight of evidence evaluation of the human and animal studies. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 6(2) :115–159.
- [Groten, 2000] Groten, J. P. (2000). Mixtures and interactions. *Food and Chemical Toxicology*, 38, Supplement 1 :S65–S71.
- [Guillouzo et al., 2007] Guillouzo, A., Corlu, A., Aninat, C., Glaise, D., Morel, F., and Guguen-Guillouzo, C. (2007). The human hepatoma HepaRG cells : a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chemico-Biological Interactions*, 168(1) :66–73.
- [Hack et al., 1995] Hack, R., Ebert, E., and Leist, K. H. (1995). Chronic toxicity and carcinogenicity studies with the insecticide endosulfan in rats and mice. *Food and Chemical Toxicology*, 33(11) :941–950.
- [Hahn et al., 1989] Hahn, M. E., Goldstein, J. A., Linko, P., and Gasiewicz, T. A. (1989). Interaction of hexachlorobenzene with the receptor for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in vitro and in vivo. evidence that hexachlorobenzene is a weak ah receptor agonist. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 270(1) :344–355.
- [Hayashi et al., 1994] Hayashi, S.-i., Watanabe, J., Nakachi, K., Eguchi, H., Gotoh, O., and Kawajiri, K. (1994). Interindividual difference in expression of human ah receptor and related p450 genes. *Carcinogenesis*, 15(5) :801–806.
- [Heath-Pagliuso et al., 1998] Heath-Pagliuso, S., Rogers, W. J., Tullis, K., Seidel, S. D., Cennijn, P. H., Brouwer, A., and Denison, M. S. (1998). Activation of the ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites†. *Biochemistry*, 37(33) :11508–11515.
- [Henriksen et al., 1997] Henriksen, G. L., Ketchum, N. S., Michalek, J. E., and Swaby, J. A. (1997). Serum dioxin and diabetes mellitus in veterans of operation ranch hand. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 8(3) :252–258.
- [Hestermann et al., 2000] Hestermann, E. V., Stegeman, J. J., and Hahn, M. E. (2000). Relative contributions of affinity and intrinsic efficacy to aryl hydrocarbon receptor ligand potency. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 168(2) :160–172.
- [Hoekstra et al., 2011] Hoekstra, R., Nibourg, G. A. A., van der Hoeven, T. V., Ackermans, M. T., Hakvoort, T. B. M., van Gulik, T. M., Lamers, W. H., Elferink, R. P. O., and Chamuleau, R. A. F. M. (2011). The HepaRG cell line is suitable for bioartificial liver application. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(10) :1483–1489.
- [Huang et al., 2004] Huang, X., Powell-Coffman, J. A., and Jin, Y. (2004). The AHR-1 aryl hydrocarbon receptor and its co-factor the AHA-1 aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator specify GABAergic neuron cell fate in c. elegans. *Development (Cambridge, England)*, 131(4) :819–828.
- [Ilavarasi et al., 2011] Ilavarasi, K., Kiruthiga, P. V., Pandian, S. K., and Devi, K. P. (2011). Hydroxytyrosol, the phenolic compound of olive oil protects human PBMC against oxidative stress and DNA damage mediated by 2,3,7,8-TCDD. *Chemosphere*, 84(7) :888–893.

-
- [Jakacka et al., 2001] Jakacka, M., Ito, M., Weiss, J., Chien, P.-Y., Gehm, B. D., and Jameson, J. L. (2001). Estrogen receptor binding to DNA is not required for its activity through the nonclassical AP1 pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 276(17) :13615–13621.
- [Jennen et al., 2010] Jennen, D. G. J., Magkoufopoulou, C., Ketelslegers, H. B., van Herwijnen, M. H. M., Kleinjans, J. C. S., and van Delft, J. H. M. (2010). Comparison of HepG2 and HepaRG by whole-genome gene expression analysis for the purpose of chemical hazard identification. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 115(1) :66–79.
- [Jossé et al., 2008] Jossé, R., Aninat, C., Glaise, D., Dumont, J., Fessard, V., Morel, F., Poul, J.-M., Guguen-Guillouzo, C., and Guillouzo, A. (2008). Long-term functional stability of human HepaRG hepatocytes and use for chronic toxicity and genotoxicity studies. *Drug Metabolism and Disposition : The Biological Fate of Chemicals*, 36(6) :1111–1118.
- [Kanebratt and Andersson, 2008] Kanebratt, K. P. and Andersson, T. B. (2008). HepaRG cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome p450 induction in humans. *Drug Metabolism and Disposition : The Biological Fate of Chemicals*, 36(1) :137–145.
- [Kataoka and Takagi, 2013] Kataoka, R. and Takagi, K. (2013). Biodegradability and biodegradation pathways of endosulfan and endosulfan sulfate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(8) :3285–3292.
- [Kaushik and Kaushik, 2007] Kaushik, P. and Kaushik, G. (2007). An assessment of structure and toxicity correlation in organochlorine pesticides. *Journal of Hazardous Materials*, 143(1–2) :102–111.
- [Kawano et al., 2010] Kawano, Y., Nishiumi, S., Tanaka, S., Nobutani, K., Miki, A., Yano, Y., Seo, Y., Kutsumi, H., Ashida, H., Azuma, T., and Yoshida, M. (2010). Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces hepatic steatosis via the upregulation of fatty acid transport. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 504(2) :221–227.
- [Kerley-Hamilton et al., 2012] Kerley-Hamilton, J. S., Trask, H. W., Ridley, C. J. A., Dufour, E., Ringelberg, C. S., Nurinova, N., Wong, D., Moodie, K. L., Shipman, S. L., Moore, J. H., Korc, M., Shworak, N. W., and Tomlinson, C. R. (2012). Obesity is mediated by differential aryl hydrocarbon receptor signaling in mice fed a western diet. *Environmental health perspectives*.
- [Kim et al., 2003] Kim, J.-S., Lim, H.-S., Cho, S.-I., Cheong, H.-K., and Lim, M.-K. (2003). Impact of agent orange exposure among korean vietnam veterans. *Industrial health*, 41(3) :149–157.
- [Kim et al., 2006] Kim, M. D., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (2006). The bHLH-PAS protein spineless is necessary for the diversification of dendrite morphology of drosophila dendritic arborization neurons. *Genes & Development*, 20(20) :2806–2819.
- [Kimbrough et al., 1977] Kimbrough, R. D., Carter, C. D., Liddle, J. A., and Cline, R. E. (1977). Epidemiology and pathology of a tetrachlorodibenzodioxin poisoning episode. *Archives of environmental health*, 32(2) :77–86.
- [Kortenkamp, 2007] Kortenkamp, A. (2007). Ten years of mixing cocktails : A review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 115(Suppl 1) :98–105.
- [Krøvel et al., 2010] Krøvel, A. V., Søfteland, L., Torstensen, B. E., and Olsvik, P. A. (2010). Endosulfan in vitro toxicity in atlantic salmon hepatocytes obtained from fish fed either fish

-
- oil or vegetable oil. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 151(2) :175–186.
- [Kumar et al., 2012] Kumar, S., Sandell, L. L., Trainor, P. A., Koentgen, F., and Duester, G. (2012). Alcohol and aldehyde dehydrogenases : retinoid metabolic effects in mouse knockout models. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1821(1) :198–205.
- [Lee et al., 2007] Lee, D.-H., Lee, I.-K., Porta, M., Steffes, M., and Jr, D. R. J. (2007). Relationship between serum concentrations of persistent organic pollutants and the prevalence of metabolic syndrome among non-diabetic adults : results from the national health and nutrition examination survey 1999–2002. *Diabetologia*, 50(9) :1841–1851.
- [Lee et al., 2006a] Lee, D.-H., Lee, I.-K., Song, K., Steffes, M., Toscano, W., Baker, B. A., and Jacobs, D. R. (2006a). A strong dose-response relation between serum concentrations of persistent organic pollutants and diabetes : results from the national health and examination survey 1999-2002. *Diabetes Care*, 29(7) :1638–1644.
- [Lee et al., 2011] Lee, D.-H., Lind, P. M., Jacobs, D. R., Salihovic, S., van Bavel, B., and Lind, L. (2011). Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in plasma predict development of type 2 diabetes in the elderly : the prospective investigation of the vasculature in uppsala seniors (PIVUS) study. *Diabetes Care*, 34(8) :1778–1784.
- [Lee et al., 2010a] Lee, D.-H., Steffes, M. W., Sjödin, A., Jones, R. S., Needham, L. L., and Jacobs, D. R. (2010a). Low dose of some persistent organic pollutants predicts type 2 diabetes : a nested case-control study. *Environmental Health Perspectives*, 118(9) :1235–1242.
- [Lee et al., 2006b] Lee, H.-K., Moon, J.-K., Chang, C.-H., Choi, H., Park, H.-W., Park, B.-S., Lee, H.-S., Hwang, E.-C., Lee, Y.-D., Liu, K.-H., and Kim, J.-H. (2006b). Stereoselective metabolism of endosulfan by human liver microsomes and human cytochrome p450 isoforms. *Drug Metabolism and Disposition*, 34(7) :1090–1095.
- [Lee et al., 2010b] Lee, J. H., Wada, T., Febbraio, M., He, J., Matsubara, T., Lee, M. J., Gonzalez, F. J., and Xie, W. (2010b). A novel role for the dioxin receptor in fatty acid metabolism and hepatic steatosis. *Gastroenterology*, 139(2) :653–663.
- [Lee et al., 2014] Lee, S.-J., Kim, K.-H., and Park, K.-K. (2014). Mechanisms of fibrogenesis in liver cirrhosis : The molecular aspects of epithelial-mesenchymal transition. *World Journal of Hepatology*, 6(4) :207–216.
- [Li and Macdonald, 2005] Li, Y. F. and Macdonald, R. W. (2005). Sources and pathways of selected organochlorine pesticides to the arctic and the effect of pathway divergence on HCH trends in biota : a review. *The Science of the total environment*, 342(1-3) :87–106.
- [Lowe et al., 2014] Lowe, M. M., Mold, J. E., Kanwar, B., Huang, Y., Louie, A., Pollastri, M. P., Wang, C., Patel, G., Franks, D. G., Schlezinger, J., Sherr, D. H., Silverstone, A. E., Hahn, M. E., and McCune, J. M. (2014). Identification of cinnabarinic acid as a novel endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that drives IL-22 production. *PloS One*, 9(2) :e87877.
- [Magliano et al., 2014] Magliano, D. J., Loh, V. H. Y., Harding, J. L., Botton, J., and Shaw, J. E. (2014). Persistent organic pollutants and diabetes : a review of the epidemiological evidence. *Diabetes & Metabolism*, 40(1) :1–14.
- [Marino et al., 2006] Marino, M., Ascenzi, P., and Acconcia, F. (2006). S-palmitoylation modulates estrogen receptor alpha localization and functions. *Steroids*, 71(4) :298–303.
- [Matthews and Gustafsson, 2006] Matthews, J. and Gustafsson, J.-Å. (2006). Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Nuclear Receptor Signaling*, 4.
-

-
- [Mauvais-Jarvis et al., 2013] Mauvais-Jarvis, F., Clegg, D. J., and Hevener, A. L. (2013). The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. *Endocrine reviews*, 34(3) :309–338.
- [Merhi et al., 2010] Merhi, M., Demur, C., Racaud-Sultan, C., Bertrand, J., Canlet, C., Estrada, F. B. Y., and Gamet-Payraastre, L. (2010). Gender-linked haematopoietic and metabolic disturbances induced by a pesticide mixture administered at low dose to mice. *Toxicology*, 267(1–3) :80–90.
- [Michalek et al., 2001] Michalek, J. E., Akhtar, F. Z., Arezzo, J. C., Garabrant, D. H., and Albers, J. W. (2001). Serum dioxin and peripheral neuropathy in veterans of operation ranch hand. *Neurotoxicology*, 22(4) :479–490.
- [Morel et al., 2000] Morel, Y., de Waziers, I., and Barouki, R. (2000). A repressive cross-regulation between catalytic and promoter activities of the CYP1a1 and CYP2e1 genes : role of h(2)o(2). *Molecular Pharmacology*, 57(6) :1158–1164.
- [Naville et al., 2013] Naville, D., Pinteaur, C., Vega, N., Menade, Y., Vigier, M., Le Bourdais, A., Labaronne, E., Debard, C., Luquain-Costaz, C., Bégeot, M., Vidal, H., and Le Magueresse-Battistoni, B. (2013). Low-dose food contaminants trigger sex-specific, hepatic metabolic changes in the progeny of obese mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*.
- [Nilsson et al., 2001] Nilsson, S., Mäkelä, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., and Gustafsson, J.-Å. (2001). Mechanisms of estrogen action. *Physiological Reviews*, 81(4) :1535–1565. Our appreciation of the physiological functions of estrogens and the mechanisms through which estrogens bring about these functions has changed during the past decade. Just as transgenic mice were produced in which estrogen receptors had been inactivated and we thought that we were about to understand the role of estrogen receptors in physiology and pathology, it was found that there was not one but two distinct and functional estrogen receptors, now called ER α and ER β . Transgenic mice in which each of the receptors or both the receptors are inactive have revealed a much broader role for estrogens in the body than was previously thought. This decade also saw the description of a male patient who had no functional ER α and whose continued bone growth clearly revealed an important function of estrogen in men. The importance of estrogen in both males and females was also demonstrated in the laboratory in transgenic mice in which the aromatase gene was inactivated. Finally, crystal structures of the estrogen receptors with agonists and antagonists have revealed much about how ligand binding influences receptor conformation and how this conformation influences interaction of the receptor with coactivators or corepressors and hence determines cellular response to ligands.
- [Oberg et al., 2005] Oberg, M., Bergander, L., Håkansson, H., Rannug, U., and Rannug, A. (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. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 85(2) :935–943.
- [Opitz et al., 2011] Opitz, C. A., Litzenburger, U. M., Sahm, F., Ott, M., Tritschler, I., Trump, S., Schumacher, T., Jestaedt, L., Schrenk, D., Weller, M., Jugold, M., Guillemain, G. J., Miller, C. L., Lutz, C., Radlwimmer, B., Lehmann, I., von Deimling, A., Wick, W., and Platten, M. (2011). An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, 478(7368) :197–203.
-

-
- [Park et al., 2010] Park, S.-K., Son, H.-K., Lee, S.-K., Kang, J.-H., Chang, Y.-S., Jacobs, D. R., and Lee, D.-H. (2010). Relationship between serum concentrations of organochlorine pesticides and metabolic syndrome among non-diabetic adults. *Journal of Preventive Medicine and Public Health*, 43(1) :1.
- [Patel et al., 2007] Patel, R. D., Hollingshead, B. D., Omiecinski, C. J., and Perdew, G. H. (2007). Aryl-hydrocarbon receptor activation regulates constitutive androstane receptor levels in murine and human liver. *Hepatology*, 46(1) :209–218.
- [Paul et al., 1994] Paul, V., Balasubramaniam, E., and Kazi, M. (1994). The neurobehavioural toxicity of endosulfan in rats : a serotonergic involvement in learning impairment. *European journal of pharmacology*, 270(1) :1–7.
- [Pelclová et al., 2002] Pelclová, D., Fenclová, Z., Preiss, J., Procházka, B., Spáčil, J., Dubská, Z., Okrouhlík, B., Lukás, E., and Urban, P. (2002). Lipid metabolism and neuropsychological follow-up study of workers exposed to 2,3,7,8- tetrachlordibenzo- p-dioxin. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 75 Suppl :S60–66.
- [Perdew, 2008] Perdew, G. H. (2008). Ah receptor binding to its cognate response element is required for dioxin-mediated toxicity. *Toxicological Sciences*, 106(2) :301–303.
- [Pesatori et al., 2003] Pesatori, A. C., Consonni, D., Bachetti, S., Zocchetti, C., Bonzini, M., Baccarelli, A., and Bertazzi, P. A. (2003). Short- and long-term morbidity and mortality in the population exposed to dioxin after the "seveso accident". *Industrial health*, 41(3) :127–138.
- [Pierre et al., 2011] Pierre, S., Bats, A.-S., Chevallier, A., Bui, L.-C., Ambolet-Camoit, A., Garlatti, M., Aggerbeck, M., Barouki, R., and Coumoul, X. (2011). Induction of the ras activator son of sevenless 1 by environmental pollutants mediates their effects on cellular proliferation. *Biochemical Pharmacology*, 81(2) :304–313.
- [Pierre et al., 2014] Pierre, S., Chevallier, A., Teixeira-Clerc, F., Ambolet-Camoit, A., Bui, L.-C., Bats, A.-S., Fournet, J.-C., Fernandez-Salguero, P., Aggerbeck, M., Lotersztajn, S., Barouki, R., and Coumoul, X. (2014). Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of liver fibrosis by dioxin. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 137(1) :114–124.
- [Platten et al., 2012] Platten, M., Litzenburger, U., and Wick, W. (2012). The aryl hydrocarbon receptor in tumor immunity. *Oncoimmunology*, 1(3) :396–397.
- [Razandi et al., 1999] Razandi, M., Pedram, A., Greene, G. L., and Levin, E. R. (1999). Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript : studies of ERalpha and ERbeta expressed in chinese hamster ovary cells. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 13(2) :307–319.
- [Reaven, 1988] Reaven, G. M. (1988). Banting lecture 1988. role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37(12) :1595–1607.
- [Ribera and Taberly, 2011] Ribera, D. and Taberly, J. (2011). Mélanges de polluants, toxicité, écotoxicité et évaluation des risques - synth_record08-0668_1a.pdf.
- [Rogue et al., 2012] Rogue, A., Lambert, C., Spire, C., Claude, N., and Guillouzo, A. (2012). Interindividual variability in gene expression profiles in human hepatocytes and comparison with HepaRG cells. *Drug Metabolism and Disposition*, 40(1) :151–158.
- [Roman-Blas et al., 2009] Roman-Blas, J. A., Castañeda, S., Largo, R., and Herrero-Beaumont, G. (2009). Osteoarthritis associated with estrogen deficiency. *Arthritis research & therapy*, 11(5) :241.
-

-
- [Rosner and Markowitz, 2013] Rosner, D. and Markowitz, G. (2013). Persistent pollutants : a brief history of the discovery of the widespread toxicity of chlorinated hydrocarbons. *Environmental research*, 120 :126–133.
- [Rozati et al., 2002] Rozati, R., Reddy, P. P., Reddanna, P., and Mujtaba, R. (2002). Role of environmental estrogens in the deterioration of male factor fertility. *Fertility and Sterility*, 78(6) :1187–1194.
- [Ruzzin et al., 2010] Ruzzin, J., Petersen, R., Meugnier, E., Madsen, L., Lock, E.-J., Lillefosse, H., Ma, T., Pesenti, S., Sonne, S. B., Marstrand, T. T., Malde, M. K., Du, Z.-Y., Chavey, C., Fajas, L., Lundebye, A.-K., Brand, C. L., Vidal, H., Kristiansen, K., and Frøyland, L. (2010). Persistent organic pollutant exposure leads to insulin resistance syndrome. *Environmental Health Perspectives*, 118(4) :465–471.
- [Safe and Wormke, 2003] Safe, S. and Wormke, M. (2003). Inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor alpha cross-talk and mechanisms of action. *Chemical research in toxicology*, 16(7) :807–816.
- [Samanez et al., 2012] Samanez, C. H., Caron, S., Briand, O., Dehondt, H., Duplan, I., Kuipers, F., Hennuyer, N., Clavey, V., and Staels, B. (2012). The human hepatocyte cell lines IHH and HepaRG : models to study glucose, lipid and lipoprotein metabolism. *Archives of physiology and biochemistry*.
- [Sarigiannis and Hansen, 2012] Sarigiannis, D. A. and Hansen, U. (2012). Considering the cumulative risk of mixtures of chemicals - a challenge for policy makers. *Environmental Health*, 11(Suppl 1) :S18.
- [Sato et al., 2008] Sato, S., Shirakawa, H., Tomita, S., Ohsaki, Y., Haketa, K., Tooi, O., Santo, N., Tohkin, M., Furukawa, Y., Gonzalez, F. J., and Komai, M. (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. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 229(1) :10–19.
- [Sharrow et al., 2002] Sharrow, S. D., Vaughn, J. L., Zidek, L., Novotny, M. V., and Stone, M. J. (2002). Pheromone binding by polymorphic mouse major urinary proteins. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 11(9) :2247–2256.
- [Shen et al., 2005] Shen, L., Wania, F., Lei, Y. D., Teixeira, C., Muir, D. C. G., and Bidleman, T. F. (2005). Atmospheric distribution and long-range transport behavior of organochlorine pesticides in north america. *Environmental science & technology*, 39(2) :409–420.
- [Silva and Beauvais, 2010] Silva, M. H. and Beauvais, S. L. (2010). Human health risk assessment of endosulfan. i : Toxicology and hazard identification. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 56(1) :4–17.
- [Sohn et al., 2004] Sohn, H.-Y., Kwon, C.-S., Kwon, G.-S., Lee, J.-B., and Kim, E. (2004). Induction of oxidative stress by endosulfan and protective effect of lipid-soluble antioxidants against endosulfan-induced oxidative damage. *Toxicology Letters*, 151(2) :357–365.
- [Song et al., 2002] Song, J., Clagett-Dame, M., Peterson, R. E., Hahn, M. E., Westler, W. M., Sicinski, R. R., and DeLuca, H. F. (2002). A ligand for the aryl hydrocarbon receptor isolated from lung. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(23) :14694–14699.
- [Sonne, 2010] Sonne, C. (2010). Health effects from long-range transported contaminants in arctic top predators : An integrated review based on studies of polar bears and relevant model species. *Environment International*, 36(5) :461–491.
-

-
- [Stanley et al., 2009] Stanley, K. A., Curtis, L. R., Simonich, S. L. M., and Tanguay, R. L. (2009). Endosulfan i and endosulfan sulfate disrupts zebrafish embryonic development. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 95(4) :355–361.
- [Tanos et al., 2012] Tanos, R., Patel, R. D., Murray, I. A., Smith, P. B., Patterson, A. D., and Perdew, G. H. (2012). Aryl hydrocarbon receptor regulates the cholesterol biosynthetic pathway in a dioxin response element-independent manner. *Hepatology*, 55(6) :1994–2004.
- [Taylor et al., 2013] Taylor, K. W., Novak, R. F., Anderson, H. A., Birnbaum, L. S., Blystone, C., Devito, M., Jacobs, D., Köhrle, J., Lee, D.-H., Rylander, L., Rignell-Hydbom, A., Tornero-Velez, R., Turyk, M. E., Boyles, A. L., Thayer, K. A., and Lind, L. (2013). Evaluation of the association between persistent organic pollutants (POPs) and diabetes in epidemiological studies : a national toxicology program workshop review. *Environmental Health Perspectives*, 121(7) :774–783.
- [Thayer et al., 2012] Thayer, K. A., Heindel, J. J., Bucher, J. R., and Gallo, M. A. (2012). Role of environmental chemicals in diabetes and obesity : A national toxicology program workshop review. *Environmental Health Perspectives*, 120(6) :779–789.
- [Tomkiewicz et al., 2013] Tomkiewicz, C., Herry, L., Bui, L.-C., Métayer, C., Bourdeloux, M., Barouki, R., and Coumoul, X. (2013). The aryl hydrocarbon receptor regulates focal adhesion sites through a non-genomic FAK/src pathway. *Oncogene*, 32(14) :1811–1820.
- [Tora et al., 1989] Tora, L., White, J., Brou, C., Tasset, D., Webster, N., Scheer, E., and Chambon, P. (1989). The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell*, 59(3) :477–487.
- [Usui, 2006] Usui, T. (2006). Pharmaceutical prospects of phytoestrogens. *Endocrine Journal*, 53(1) :7–20.
- [Vandenberg, 2014] Vandenberg, L. N. (2014). Non-monotonic dose responses in studies of endocrine disrupting chemicals : bisphenol a as a case study. *Dose-Response : A Publication of International Hormesis Society*, 12(2) :259–276.
- [Verreault et al., 2010] Verreault, J., Gabrielsen, G. W., and Bustnes, J. O. (2010). The svalbard glaucous gull as bioindicator species in the european arctic : insight from 35 years of contaminants research. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 205 :77–116.
- [Vogel and Matsumura, 2009] Vogel, C. F. A. and Matsumura, F. (2009). A new cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and RelB, a member of the NF- κ b family. *Biochemical Pharmacology*, 77(4) :734–745.
- [Wang et al., 2012] Wang, Y., Wang, Q., Wu, B., Li, Y., and Lu, G. (2012). Correlation between TCDD acute toxicity and aryl hydrocarbon receptor structure for different mammals. *Ecotoxicology and environmental safety*.
- [Weber et al., 2010] Weber, J., Halsall, C. J., Muir, D., Teixeira, C., Small, J., Solomon, K., Hermanson, M., Hung, H., and Bidleman, T. (2010). Endosulfan, a global pesticide : A review of its fate in the environment and occurrence in the arctic. *Science of The Total Environment*, 408(15) :2966–2984.
- [Weber et al., 1991] Weber, L. W. D., Lebofsky, M., Greim, H., and Rozman, D. K. (1991). Key enzymes of gluconeogenesis are dose-dependently reduced in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-treated rats. *Archives of Toxicology*, 65(2) :119–123.
- [Weigt et al., 2013] Weigt, C., Hertrampf, T., Kluxen, F. M., Flenker, U., Hülsemann, F., Fritzscheier, K. H., and Diel, P. (2013). Molecular effects of ER alpha- and beta-selective agonists
-

-
- on regulation of energy homeostasis in obese female wistar rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 377(1-2) :147–158.
- [Weigt et al., 2012] Weigt, C., Hertrampf, T., Zoth, N., Fritzemeier, K. H., and Diel, P. (2012). Impact of estradiol, ER subtype specific agonists and genistein on energy homeostasis in a rat model of nutrition induced obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 351(2) :227–238.
- [Wetherill et al., 2005] Wetherill, Y. B., Fisher, N. L., Staubach, A., Danielsen, M., de Vere White, R. W., and Knudsen, K. E. (2005). Xenoestrogen action in prostate cancer : pleiotropic effects dependent on androgen receptor status. *Cancer Research*, 65(1) :54–65.
- [Wormke et al., 2003] Wormke, M., Stoner, M., Saville, B., Walker, K., Abdelrahim, M., Burghardt, R., and Safe, S. (2003). The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor α through activation of proteasomes. *Molecular and Cellular Biology*, 23(6) :1843–1855.
- [Wu et al., 2013] Wu, H., Bertrand, K. A., Choi, A. L., Hu, F. B., Laden, F., Grandjean, P., and Sun, Q. (2013). Persistent organic pollutants and type 2 diabetes : a prospective analysis in the nurses’ health study and meta-analysis. *Environmental Health Perspectives*, 121(2) :153–161.
- [Xie et al., 2012] Xie, G., Peng, Z., and Raufman, J.-P. (2012). Src-mediated aryl hydrocarbon and epidermal growth factor receptor cross talk stimulates colon cancer cell proliferation. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 302(9) :G1006–1015.
- [Yang et al., 2012] Yang, L., Wu, D., Wang, X., and Cederbaum, A. I. (2012). Cytochrome p4502e1, oxidative stress, JNK, and autophagy in acute alcohol-induced fatty liver. *Free Radical Biology & Medicine*, 53(5) :1170–1180.
- [Yavuz et al., 2007] Yavuz, Y., Yurumez, Y., Kücük, H., Ela, Y., and Yüksel, S. (2007). Two cases of acute endosulfan toxicity. *Clinical Toxicology*, 45(5) :530–532.
- [Zhang et al., 2012] Zhang, W., Sargis, R. M., Volden, P. A., Carmean, C. M., Sun, X. J., and Brady, M. J. (2012). PCB 126 and other dioxin-like PCBs specifically suppress hepatic PEPCCK expression via the aryl hydrocarbon receptor. *PLoS ONE*, 7(5) :e37103.

Résumé

Des études épidémiologiques ont montré que l'exposition à certains xénobiotiques est associée à une augmentation de la prévalence des maladies métaboliques. L'Homme est exposé à des mélanges de xénobiotiques de manière chronique et inévitable. Nous avons étudié les effets de l'interaction de deux xénobiotiques sur le métabolisme du foie, organe majeur de détoxification de l'organisme. Nous avons choisi deux perturbateurs endocriniens et polluants organiques persistants, qui activent des voies de signalisation différentes: la 2, 3, 7, 8 tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD), agissant via le récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR), et l' α -endosulfan, un pesticide organochloré, qui peut agir via la voie du récepteur aux œstrogènes (ER) ou du récepteur X aux pregnanes (PXR).

Notre objectif est de déterminer l'effet du mélange de ces polluants par rapport à chaque polluant isolé sur la régulation de certaines voies du métabolisme hépatique *in vitro* dans la lignée hépatocytaire humaine, HepaRG.

Dans une première publication, une étude du transcriptome de cellules HepaRG différenciées a été effectuée. Ces cellules ont été exposées pendant 30 heures à 25nM de TCDD, 10 μ M d' α -endosulfan, ou au mélange. Nous avons observé que le mélange inhibe fortement l'expression de certains gènes impliqués dans le métabolisme glucidique et dans celui des alcools.

Dans une seconde étude, nous avons donc étudié le mécanisme d'action du mélange sur le métabolisme glucidique. L'expression de deux gènes de la néoglucogénèse hépatique, le transporteur de glucose 2 (Glut2) et la glucose 6 phosphatase (G6Pc), est réduite de plus de 80% par le mélange. L'expression d'autres gènes du métabolisme glucidique (pyruvate kinase, glycogène synthase, glycogène phosphorylase, pyruvate déshydrogénase 2) est aussi diminuée, suggérant que le mélange peut affecter ce métabolisme de manière significative. De plus, la production de glucose diminue de 80% avec le mélange dans des conditions néoglucogéniques. En condition glycolytique, l'oxydation du glucose en CO₂ diminue de 30% après 72 heures d'exposition au mélange. Un traitement à plus long terme (8 jours) avec des doses plus faibles des polluants (0.2 à 5nM de TCDD, 3 μ M d' α -endosulfan) diminue aussi l'expression de la G6Pc et de Glut2. Nous avons montré que la TCDD active bien la voie du AhR, et que le ER est impliqué dans l'action de l' α -endosulfan.

Dans la troisième partie de cette thèse, nous avons étudié la régulation de plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme de l'alcool (alcool déshydrogénases, ADHs, cytochrome P450 2E1, CYP2E1) après l'activation du AhR. Les agonistes du AhR entraînent la diminution de l'expression des ARNm des ADH1, 4, 6 et du CYP2E1 et des protéines correspondantes. Nous avons montré que cette régulation utilise la voie génomique du AhR. De plus, cet effet est également observé après traitement de 8 jours par de faibles doses de TCDD.

L'exposition chronique de l'Homme à de faibles doses de xénobiotiques en mélange pourrait affecter le métabolisme glucidique hépatique et contribuer, en partie, au développement du syndrome métabolique.

Mots clefs : dioxine, pesticide organochloré, métabolisme.