HAL
open science

Caractérisation des effets métaboliques d'un mélange de polluants à faibles doses dans un modèle de souris déficientes en oestrogènes

Benoit Julien

To cite this version:

Benoit Julien. Caractérisation des effets métaboliques d'un mélange de polluants à faibles doses dans un modèle de souris déficientes en oestrogènes. Endocrinologie et métabolisme. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1092 . tel-02569438

HAL Id: tel-02569438

https://theses.hal.science/tel-02569438

Submitted on 11 May 2020

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

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

N°d'ordre NNT : 2019LYSE1092

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° ED 205
(Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé)

Spécialité de Doctorat : Biologie

Soutenue publiquement le 09/07/2019, par :
Benoit JULIEN

Caractérisation des effets métaboliques d'un mélange de polluants à faibles doses dans un modèle de souris déficientes en œstrogènes

---

Devant le jury composé de :

PUGEAT, Michel (Professeur émérite)	Bron	Président
MHAOUTY-KODJA, Sakina (DR/CNRS)	Paris	Rapporteure
CORLU, Anne (DR/CNRS)	Rennes	Rapporteure
ODET-RADVAY, Fanny (Enseignante)	Lyon	Examinatrice
VIDAL, Hubert (DR/INSERM)	Lyon	Examinateur
LE MAGUERESSE-BATTISTONI, Brigitte (DR/INSERM)	Lyon	Directrice de thèse

Remerciements

En premier lieu, je remercie Emmanuelle CANET-SOULAS et Hubert VIDAL de m'avoir permis d'effectuer mon doctorat dans l'Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé (EDISS), au sein du laboratoire de recherche en Cardiovasculaire, Métabolisme, diabétologie et Nutrition (CarMeN).

Je remercie également les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté d'être présents le jour de ma soutenance, et en particulier Sakina MHAOUTY-KODJA et Anne CORLU d'avoir été rapporteures de mon mémoire.

J'ai eu l'opportunité d'intégrer, au laboratoire, l'équipe 1 : « Adaptations Nutritionnelles, Environnement et Diabètes », dans laquelle plusieurs axes de recherche sont développés. Plus précisément, j'ai pu effectuer mon travail de thèse sur la thématique : « Impact des polluants environnementaux dans les maladies métaboliques », sous la direction de Brigitte LE MAGUERESSE-BATTISTONI. Je la remercie sincèrement d'avoir été ma directrice de thèse, et de m'avoir intégré dans l'équipe TOX. Pendant presque 4 ans, j'ai pu bénéficier de son expérience certaine dans la recherche, qui a été précieuse pour mon travail au laboratoire, mais aussi pour mon évolution personnelle. En effet, j'ai beaucoup appris à ses côtés, et, même si j'ai décidé de ne pas continuer mon parcours professionnel dans la recherche, ses nombreux conseils et critiques m'ont poussé à me perfectionner et me serviront pour mon activité future.

Je ne peux pas oublier les autres membres de l'équipe TOX, à savoir Danielle, Claudie, et Nathalie, sans qui je n'aurais pas pu effectuer mon travail dans d'aussi bonnes conditions. Merci à Danielle pour tes conseils techniques, Claudie pour m'avoir formé à l'expérimentation sur les souris, et Nathalie pour la formation sur les techniques indispensables pour mon travail à la paillasse (extraction d'ARN/protéines, western-blot, dosages qPCR, et j'en passe). Je remercie aussi Emmanuel pour avoir partagé ton expérience de thésard dans cette équipe. Tous tes conseils m'ont permis de prendre consience du travail accompli pendant ce doctorat, et d'en être fier.

Mes remerciements vont également aux autres thésards qui sont devenus jeunes docteurs récemment. Je pense en particulier à Marwa et Florian, avec qui j'ai partagé de bons moments à Lisbonne lors du congrès EASD (on se souviendra du restaurant Sakura, le paradis de la nourriture asiatique). Merci Marwa pour ton expertise et tes remarques sur la partie de mon manuscrit qui traite des macrophages. Merci (ou pas) à Florian pour le challenge Mario Kart (je réfléchirai à deux fois avant de te lancer un défi). Nous avons réussi à encadrer un groupe de lycéens pendant une semaine, nous pouvons nous féliciter encore une fois. Je me souviendrais de ton investissement pour créer la vidéo de thèse de Marwa, à laquelle tu as réussi à faire participer tous les thésards et masters du labo.

Cette anecdote me permet de rebondir sur les post doc, thésards et masters que j'ai rencontrés pendant ma thèse, et avec qui j'ai partagé des moments privilégiés et divertissants. Je remercie en bloc Kassem, Céline, Clémence, Camille, Agathe, Arthur, Julien, Johan Guillain et Quentin. Koh Lanthèse restera certainement le meilleur souvenir de ma thèse avec la majeure partie d'entre vous. Je dois probablement oublier certaines personnes, donc si vous vous reconnaissez et lisez ces quelques lignes, je m'excuse d'avance.

Je tiens à remercier particulièrement Harimalala, stagiaire de M1 que j'ai eu le plaisir de former. Très organisée, attentive et curieuse, tu m'as filé un bon coup de main pendant ma 2e année de thèse. Je garde précieusement ton cadeau de Madagascar, qui, à chaque fois que je le vois, me donne envie de visiter ce pays.

Je voudrais remercier les chercheurs et chercheuses avec qui j'ai pu avoir des discussions intéressantes, passionnés par leur travail et engagés dans la recherche. Etant d'un naturel plutôt curieux, j'ai appris énormément à vos côtés.

Supporter ces années de dur labeur n'a pas été simple tous les jours. Heureusement, on peut compter sur certaines personnes pour mettre un peu d'ambiance au laboratoire. Parmi elles, on retrouve le trio infernal de CarMeN, composé d'Aurélie, Stéphanie et Pascal. Entre les pauses goûter, les quizz musicaux, le tableau des phrases à double sens (rempli à 80% par des phrases d'Aurélie), les restos, les escapes games, et les anniversaires, j'ai passé de très bons moment en votre compagnie. En vérité, il faudrait rajouter 100 pages de plus au manuscrit pour faire une liste exhaustive de toutes nos aventures. Merci pour ces moments de partage, de rires, de discussions sérieuses (ou pas). Merci aussi d'avoir relu mon manuscrit de thèse et repéré les nombreuses « coquilles » que j'ai pu corriger. Je n'oublierai plus de mettre les mots latins en italique Pascal, promis.

Merci Jiji pour nous avoir ravitaillé, avec Florian et Céline, en bonbons et autres sucreries. On sait maintenant que les fraises Tagada, en plus d'augmenter notre glycémie, augmentent notre efficacité au travail.

Merci aux filles du plateau génomique pour leurs formations et conseils précieux pour réussir au mieux mes RT-qPCR, qui représentaient plus de la moitié de mes activités à la paillasse. Merci, surtout, pour votre bonne humeur et les discussions divertissantes qu'on a pu partager. P.S. : mention spéciale à Sandra, grâce à qui j'ai pu acheter ma première voiture.

Merci à Marie-Agnès d'avoir apporté des réponses à mes questionnements sur l'origine du problème des western-blot qui ne fonctionnent pas.

Je remercie plus généralement l'ensemble des ITA qui m'ont formé, et qui ont contribué, de près ou de loin, à la réussite de mon travail.

Après les collègues de boulot, je souhaite remercier tout mon entourage, en commençant par mes amis. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble, qui m'ont permis de m'évader un peu du quotidien de la thèse parfois difficile, mais aussi de prendre du recul sur mon travail et de me perfectionner. Je me souviendrais tout particulièrement de l'édition 2019 du Hellfest, qui fut une expérience inoubliable (Apéro !).

Je remercie évidemment ma famille, et surtout mes parents, pour leur amour et leur soutien inconditionnel pendant mon parcours universitaire. Ceci m'a donné envie d'aller au bout de cette expérience et de décrocher le diplôme de doctorat. Pour l'anecdote, en plus de votre médecin généraliste, vous connaîtrez un autre docteur Julien, et ce sera votre fils.

Pour conclure, mes plus sincères remerciements vont à ma compagne qui, en plus m'avoir encouragé et accordé sa confiance, a dû me supporter pendant ces années de travail. Mon évolution professionnelle et personnelle, je la dois à beaucoup de personnes, mais sans toi, je n'aurais jamais eu l'ambition d'aller jusque là. Tu es une véritable source de motivation qui me pousse à me dépasser chaque jour, et pour ça, je ne t'en remercierais jamais assez. Merci Morgane.

Résumé

1 Français

La ménopause est un facteur de risques associé au développement des maladies métaboliques. Du fait de ce déficit hormonal, les femmes ménopausées pourraient présenter des risques particuliers une fois exposées à des agents chimiques capables de perturber le système endocrinien.

Pour en savoir plus, nous avons mis au point un modèle de souris ovariectomisées supplémentées ou non en œstradiol (E2), et exposées de manière chronique à un mélange de polluants (TCDD, PCB153, DEHP et BPA) ajoutés à une alimentation obésogène. Chaque polluant est utilisé à une dose équivalente à la Dose Journalière Tolérable, et l'exposition recouvre différents stades de développement, incluant ou non la période maternelle (gestation + lactation).

Nos résultats indiquent qu'en condition d'obésité induite par le régime, l'ovariectomie accentue la prise de poids, l'intolérance au glucose et l'insulino-résistance chez les souris femelles adultes. Ce phénotype est associé à une diminution de la signalisation œstrogénique dans le foie et une dérégulation de l'adipogenèse et de l'inflammation dans le tissu adipeux. De manière intéressante, le mélange de polluants réduit l'impact délétère de l'ovariectomie sur le phénotype métabolique, possiblement par une amélioration de la signalisation œstrogénique dans le foie et le tissu adipeux. Nos résultats suggèrent fortement que ces effets dépendent d'une exposition maternelle.

En conclusion, nous montrons que notre mélange de polluants possède une activité œstrogéno-mimétique. Ceci pourrait avoir une implication dans la compréhension du rôle des polluants environnementaux dans le développement des maladies métaboliques chez la femme en transition ménopausique.

Mots-clés : troubles métaboliques, régime obésogène, perturbateurs endocriniens, exposition maternelle, ovariectomie, supplémentation en œstradiol.

2 Anglais

Characterization of the metabolic effects of a low-dose mixture of pollutants in a mouse model of estrogen deficiency

Menopause is a risk factor associated with the development of metabolic diseases. Because of this hormonal deficiency, postmenopausal women may be at particular risk when exposed to chemical agents that can disrupt the endocrine system.

To get more insights, we have developed a model of ovariectomized mice supplemented or not with œstradiol (E2), and chronically exposed to a mixture of pollutants (TCDD, PCB153, DEHP and BPA) added to an obesogenic diet. Each pollutant was used at a dose close to its Tolerable Daily Intake dose, and the exposure covers different stages of development, including or not the maternal period (gestation + lactation).

Our results indicate that in diet-induced obesity, ovariectomy increases weight gain, glucose intolerance, and insulin resistance in adult female mice. This phenotype is associated with a decreased estrogenic signaling in the liver and a deregulation of adipogenesis and inflammation in adipose tissue. Interestingly, the mixture of pollutants reduces the deleterious impact of ovariectomy on the metabolic phenotype, possibly through an improvement in estrogenic signaling in the liver and adipose tissue. Our results strongly suggest that these effects depend on maternal exposure.

In conclusion, we show that our pollutant mixture has an estrogeno-mimetic activity. This could have implications in understanding the role of environmental pollutants in the development of metabolic diseases in women in menopausal transition.

Keywords: metabolic disorders, high-fat high-sucrose diet, endocrine disruptors, maternal exposure, ovariectomy, œstradiol replacement.

Avant-propos

1,9 milliard! Ce chiffre alarmant correspond au nombre de personnes adultes dans le monde en surpoids, et parmi eux 650 millions sont obèses. Depuis 1975, le nombre de cas d'obésité a presque triplé à l'échelle mondiale, et en France, la prévalence de l'obésité était de 15% en 2012, ce qui représente une augmentation de 75% par rapport à 1997. Cette pathologie connait une forte incidence, tout comme le diabète. En 2000, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) prévoyait que 330 millions de personnes seraient atteintes de diabète de type 2 en 2030. En 2014, elles étaient déjà 422 millions, soit une prévalence totale de 8,5 % (1).

L'obésité représente, à l'échelle de la planète, une menace pour la santé publique. Ainsi, l'OMS a déclaré qu'environ 2,8 millions de personnes meurent chaque année des conséquences de l'obésité. L'obésité est un enjeu sociétal pour la santé mais également pour la qualité de vie. En 2015, l'équipe du docteur Grover avait publié dans The Lancet qu'un adulte sévèrement obèse peut perdre jusqu'à 8 années de vie en bonne santé (2). Ces maladies métaboliques ont également un coût sanitaire et social important. L'augmentation de la charge pondérale est un facteur de risque pour de nombreuses maladies chroniques comme les maladies cardiovasculaires, le diabète de type 2, les troubles respiratoires et musculo-squelettiques ainsi que certains cancers. Par ailleurs, rien que pour le diabète de type 2, les dépenses annuelles mondiales s'élevaient à 825 milliards de dollars en 2014 (3). La stigmatisation, les difficultés d'insertion sociale et professionnelle et les difficultés psychologiques vécues par les personnes obèses participent également au coût social élevé de ce problème de santé.

Tout le monde n'est pas égal face à l'obésité. En effet, l'âge, le sexe, la catégorie socio-professionnelle, la zone géographique ou encore le niveau de revenu sont autant de facteurs engendrant des disparités entre les populations. Par exemple, en 2014, la proportion de femmes obèses (14.9%) était supérieure à celle des hommes (10.8%) dans la population mondiale. Par ailleurs, l'augmentation de la disponibilité alimentaire, l'industrialisation, l'augmentation de la densité calorique des produits alimentaires de plus en plus transformés, l'utilisation régulière de la voiture et des transports en communs et l'augmentation du temps passé devant les écrans et les loisirs sédentaires sont autant de facteurs qui contribuent au déséquilibre de la balance énergétique en faveur de l'apparition des maladies métaboliques.

Depuis plusieurs années, le paradigme de l'obésité a été de considérer cette pathologie simplement par la fonction reliant l'énergie ingérée à celle dépensée. En conséquence, les stratégies de prévention de l'obésité visaient essentiellement au contrôle de l'alimentation et à l'augmentation de l'exercice. Or, de nombreux autres facteurs de risques existent. Classiquement, on retrouve la génétique, le sommeil, le stress ou encore le moment du repas. Mais plus récemment, l'intérêt s'est porté sur d'autres éléments comme l'environnement maternel ayant une influence majeure sur le développement, mais aussi la communauté bactérienne intestinale dont l'équilibre participe à l'homéostasie de l'hôte, ou encore l'exposition environnementale aux polluants chimiques, capables de moduler le métabolisme glucido-lipidique en interférant avec le système hormonal. Dans ce manuscrit de thèse, nous allons nous intéresser à la perturbation endocrinienne du métabolisme énergétique par les agents chimiques de l'environnement en décrivant, tout d'abord, les mécanismes à l'origine de l'insulino-résistance dans les maladies métaboliques, puis leur modulation par les œstrogènes et, enfin, à l'implication possible des perturbateurs endocriniens dans l'initiation et le développement des troubles du métabolisme, en particulier dans un modèle expérimental de souris femelles.

Table des matières

REMERCIEMENTS **2**

RESUME **5**

1 FRANÇAIS 5
2 ANGLAIS 6

AVANT-PROPOS **7**

TABLE DES MATIERES **9**

LISTE DES ABREVIATIONS **12**

PUBLICATIONS ET PARTICIPATIONS AUX CONGRES **16**

3 LISTE DES PUBLICATIONS 16
4 LISTE DES COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES 17
4.1 Communications orales 17
4.2 Communications affichées 17

INTRODUCTION **18**

1 OBESITE ET DIABETES : PERTURBATION DU METABOLISME ENERGETIQUE 18
1.1 Généralités 18
1.1.1 Obésité 18
1.1.2 Diabètes 21
1.1.3 Métabolisme énergétique 22
1.1.3.1 *Phase absorptive* *23*
1.1.3.2 *Phase post-absorptive* *24*
1.1.3.3 *Régulation hormonale du métabolisme énergétique* *25*
1.2 L'insuline 26
1.2.1 La sécrétion de l'insuline 26
1.2.2 La signalisation moléculaire de l'insuline 28
1.2.2.1 *Mécanismes d'action de l'insuline dans le muscle* *28*
1.2.2.2 *Mécanismes d'action de l'insuline dans le foie* *29*
1.2.2.3 *Mécanismes d'action de l'insuline dans le tissu adipeux* *30*
1.3 L'insulino-résistance 31
1.3.1 Qu'est-ce que l'insulino-résistance ? 31
1.3.2 Les outils de mesure de l'insulino-résistance 32
1.3.3 Les conséquences de l'insulino-résistance sur les tissus 33
1.3.3.1 *Tissu adipeux et insulino-résistance* *33*
1.3.3.2 *Foie et insulino-résistance* *38*
1.3.3.3 *Intestin et insulino-résistance* *39*
2 REGULATION DU METABOLISME ENERGETIQUE 41
2.1 Dimorphisme sexuel et métabolisme 41
2.1.1 Le sexe génétique 41
2.1.2 Le pic de testostérone périnatal 42
2.1.3 Au stade adulte 42
2.2 Les stéroïdes sexuels 43
2.2.1 Les œstrogènes 44
2.2.1.1 *La synthèse des œstrogènes* *45*
2.2.1.2 *Le transport et le métabolisme des œstrogènes* *46*
2.2.2 Les récepteurs aux œstrogènes 48

2.2.2.1 *Généralités* ... *48*
2.2.2.2 *Les mécanismes d'actions* ... *51*
2.3 Les effets métaboliques des œstrogènes ... 52
2.3.1 Les modèles d'ovariectomie ... 52
2.3.2 Les modèles KO : ... 58
2.3.2.1 *Prise alimentaire et dépense énergétique* ... *58*
2.3.2.2 *Lipogenèse dans le foie et le tissu adipeux* ... *59*
2.3.2.3 *Sensibilité à l'insuline* ... *60*
2.3.2.4 *Cellule bêta et survie* ... *61*
3 LE CONCEPT DE PERTURBATION ENDOCRINIENNE (PE) ... 63
3.1 Historique ... 63
3.2 Liste des PE ... 65
3.3 Les modes d'action des PE ... 70
3.3.1 La perturbation de la synthèse, du transport, du métabolisme et de l'excrétion de l'hormone ... 70
3.3.2 L'action dite « agoniste » ... 70
3.3.3 L'action dite « antagoniste » ... 71
3.3.4 Les SERM ... 71
3.4 Les caractéristiques des PE ... 72
3.4.1 Effets à faible dose ... 73
3.4.2 Effets non monotones ... 75
3.4.3 Effets différés par rapport à l'exposition ... 76
3.4.4 Effets cocktails ... 77
4 LIEN ENTRE PE ET PERTURBATIONS METABOLIQUES ... 80
4.1 Le métabolisme des xénobiotiques ... 80
4.1.1 Les récepteurs aux xénobiotiques et les PPAR ... 80
4.1.2 Les enzymes de phase I ... 82
4.1.3 Les enzymes de phase II ... 83
4.1.4 Le transport et l'élimination des xénobiotiques ... 83
4.2 Régulation du métabolisme énergétique par les récepteurs nucléaires ... 84
4.3 Données de la littérature sur les effets métaboliques des PE ... 86
4.3.1 Les études épidémiologiques ... 86
4.3.2 Les études expérimentales ... 89

OBJECTIFS ... 95

RESULTATS ... 98

1 ARTICLE 1 ... 98
2 ARTICLE 2 ... 108

DISCUSSION GENERALE ... 148

1 CARACTERISATION DU METABOLISME ENERGETIQUE CHEZ LES SOURIS OVARIECTOMISEES ... 150
2 EFFETS DE L'ŒSTRADIOL, EN PARTICULIER SUR LE METABOLISME HEPATIQUE DU CHOLESTEROL ... 151
3 EFFETS DES POLLUANTS SUR LE PROFIL METABOLIQUES DES SOURIS OVARIECTOMISEES ... 152
4 CARACTERISTIQUES DE L'IMPACT DES ŒSTROGENES SELON LES DEPOTS ADIPEUX (SOUS-CUTANE *VS* VISCERAL) ... 154
5 COMPARATIF DES EFFETS INDUITS PAR LES POLLUANTS AVEC LES EFFETS DE L'ŒSTRADIOL 156
6 LA QUESTION DES MELANGES : EXTRAPOLATION DES RESULTATS DU TRAVAIL DE THESE A LA SITUATION D'UNE EXPOSITION MULTIPLE ... 157
7 LES LIMITES DU MODELE ... 158

CONCLUSION ... 161

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ... 162

ANNEXES **182**

1 ARTICLE CHEMOSPHERE 2019 182
2 RESUME DES COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES + POSTERS 200
3 ARTICLES EN COLLABORATION 211

Liste des abréviations

A

ABC : ATP Binding Cassette
ACC : Acetyl CoA Carboxylase
Acly : ATP citrate lyase
Acox1 : Acyl-coenzyme A oxidase 1
AdipoR : Adiponectin Receptor 1/2
ADME : Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADP : Adénosine Diphosphate
AF : Activation Function 1/2
AGL : Acides Gras Libres
Agrp : Agouti-related peptide
AhR : Aryl hydrocarbon Receptor
Akt : Protein Kinase B
AMP : Adénosine MonoPhosphate
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
AMPK : Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase
ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'Environnement et du travail
AP-1 : Activator Protein 1
ApoE : Apolipoprotein E
ARC : Noyau Arqué
Arom-KO : Aromatase-KO
ARNm : Acide ribonucléique messager
ARNT : Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
AS160 : Akt Substrate of 160 kDa
ATGL : Adipose Triglyceride Lipase
ATP : Adénosine Triphosphate

B

BBzP : Benzyl butyl phthalate
bHLH : Basic helix-loop-helix
BPA : Bisphénol A
BSEP : Bile Salt Export Pump

C

CAR : Constitutive Androstane Receptor
CCR2 : C-C chemokine receptor type 2
CD : Chow Diet
CD36 : Cluster of differentiation 36
CDRNM : Courbe dose-réponse nonmonotone
CEBPα : CCAAT/enhancer-binding protein alpha
COMT : Catechol-O-methyltransferase
Cpt1 : Carnitine palmitoyltransferase 1
CYP : Cytochrome P450

D

DAG : Diacylglycérol
DBD : DNA Binding Domain
DDE : Dichlorodiphenyldichloroethylene
DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane
DEHP : Phtalate di(2-ethylhexyl) phtalate
DES : Diéthylstilbestrol
DGAT : Diacylglycerol OAcyltransferase
DHEA : Dehydroepiandrosterone
DHEA-S : Dehydroepiandrosterone-sulfate
DiDP : Diisodecyl phthalate
DiNP : Diisononyl phthalate
DJA : Dose Journalière Admissible
DJT : Dose Journalière Tolérable
DnBP : Di- n -butyl phthalate
DOHaD : Developmental Origin of Health and Disease
DT2 : Diabète de Type 2
DPN : 2,3-bis(4-Hydroxyphenyl)-propionitrile

E

E1/2/3/4 : Estriol/Œstradiol/Estrone/Estetrol

E1/2/3/4-S : Estriol/Œstradiol/Estrone/Estetrol-sulfate
EE2 : Ethinylœstradiol
EFSA : European Food Safety Authority
EGFR : Epidermal growth factor receptor
EPA : Environmental protection agency
ER : Estrogen Receptor
ERE : Estrogen Response Element
EST : Estrogen sulfotransferase

F

Fatp5 : Fatty Acid Transport Protein 5
FABP4 : Fatty acid binding protein 4
FAS : Fatty acid synthase
FDA : Food and drug administration
FFA : Free Fatty Acids
Fgf21 : Fibroblast growth factor 21
FOX01 : Forkhead box O1

G

G6P : Glucose-6-phosphate
G6Pase : Glucose-6-phosphatase
Gαs : protéine G α stimulatrice
Ghsr : Growth hormone secretagogue receptor
GIP : Gastric inhibitory polypeptide
GIR : Glucose Infusion Rate
GK : Glucokinase
GLP-1 : Glucagon-like peptide-1
GLUT : Glucose Transporter
GP : Glycogen Phosphorylase
GPER : G protein-coupled estrogen receptor 1
GPR30 : G protein-coupled receptor 30
GS : Glycogen Synthase
GSIS : Glucose-stimulated insulin secretion
GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3
GST : Glutathion S-transférase

H

H2AX : H2A histone family member X
HFD : High-Fat Diet
HFHC : High-Fat High-Cholesterol
HK II : Hexokinase II
HOMA-IR : Homeostasis Model Assessmnent of Insulin Resistance
HSD : Hydroxysteroid dehydrogenase
HSL : Hormone Sensitive Lipase

I

icv : intracerebroventricular
IL-6 : Interleukine-6
IMC : Indice de Masse Corporelle
Insr : Insulin receptor
IRS : Insulin Receptor Substrate

K

Kd : Constante de Dissociation
kDa : Kilodalton
KO : Knockout

L

LB : Lymphocytes B
LBD : Ligand Binding Domain
LDH : Lactate dehydrogenase
Lepr : Leptin receptor
LFD : Low-Fat Diet
LPL : Lipoprotein Lipase
LT : Lymphocytes T
LTovx : Long Term ovariectomy
LTreg : Lymphocytes T régulateurs

M

M1/2 : Macrophage de type 1/2
MAPK : Mitogen-activated protein kinase
MBzP : Methylbenzylpiperazine
MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein-1
M-CSF : Macrophage colony-stimulating factor
MDR1 : Multidrug Resistant 1

MEHP : Mono(2-éthylhexyl)-phtalate
MEOPH : Mono(2-éthyl-5-oxohexyl) Phthalate
MG : Masse Grasse
MGL : Monoacylglycerol lipase
MHO : Metabolically healthy obese
MISS : Membrane-initiated steroid signaling
MM : Masse Maigre
MONW : Metabolically obese normal weight
MRP2 : Multidrug resistance-associated protein 2
mTORC1 : Mammalian target of rapamycin complex 1

N

NA : Noradrenaline
NAFLD : Non-alcoholic fatty liver disease
NCEP-ATP III : National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III
NHANES : National Health and Nutrition Examination Survey NHS :
NHS: Nurse Health Study
NK :Natural Killer
NKT : Natural Killer T
NOAEL : No Observable Adverse Effect Level
NPV : Noyau paraventriculaire
NR : Nuclear Receptor

O

OGTT : Oral Glucose Tolerance Test
OH : Hydroxyle
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OR : Odds Ratio

P

P450SCC : P450 side-chain cleaving enzyme
PAI-1 : Plasminogen activator inhibitor-1
PAS : Per-Arnt-Sim
PC : Pyruvate carboxylase
PCB : Polychlorobiphényles
PDE3B : Phosphodiesterase 3B
PDK1/2 : Phosphoinositol dependant Kinase 1/2
PE : Perturbateur Endocrinien
PEPCK : Phosphoénolpyruvate carboxykinase
PFK : Phosphofructokinase
PI3K : Phosphoinositol 3 kinase
PiP2 : Phosphatidylinositol 2 phosphate
PiP3 : Phosphatidylinositol 3 phosphate
PK : Pyruvate kinase
PKA : Protein Kinase A
PKB : Protein Kinase B
PKC : Protein Kinase C
POMC : Proopiomélanocortine
POP : Polluant organique persistant
PPAR : Peroxisome proliferator activated receptor
PPRE : PPAR response elements
PPT : Propyl pyrazol triol
PTB : Phosphotyrosine binding
PXR : Pregnane X receptor

R

RCPG : Récepteurs couplés aux protéines G
REACh : Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals
RNA-seq : RNA sequencing
ROS : Reactive Oxygen Species
RXR : Retinoid X receptor

S

sc. : sous-cutané
SERM : Selective estrogen receptor modulator
SH2 : Src homology 2
SHBG : Sex hormone-binding globulin
SIN : Substitue It Now

SLC : Solute carrier
SNC : Système Nerveux Central
SP-1 : Specificity protein-1
SREBP-1c : Sterol Regulatory element binding protein-1c
Sry : Sex-determining region of Y chromosom
STovx : Short Term ovariectomy
STS : Steroid sulfatase
STZ : Streptozotocine
SULT : : Sulfotransferase
SWHS : Seveso Women's Health Study

T

T3 : Triiodothyronine
T4 : Thyroxine
TA : Tissu Adipeux
TAbrun : Tissu Adipeux brun
TAsc : Tissu Adipeux sous-cutané
TAv : Tissu Adipeux viscéral
TBBPA : Tetrabromobisphénol A
TBT : Tributylétain
Tc : Température corporelle
TCDD : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine
TEDX : The Endocrine Disruption Exchange
TEF : Toxic Equivalent Factor
TEQ : Toxic Equivalent Quotient
TG : Triglycérides
TNC : Trans-nonachlore
TNF-α : Tumor Necrosis Factor-α

U

Ucp2 : Uncoupling protein 2
UDP : Uridine diphosphate
UE : Union Européenne
UGT : UDP-glucuronosyltransferase
UNEP : United Nations Environment Program

V

VLDL : Very Low Density Lipoprotein
VMH : Ventromedial hypothalamus
VTR : Valeurs toxicologiques de référence

Publications et participations aux congrès

3 Liste des publications

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

Labaronne E, Pinteur C[1], Vega N[1], Pesenti S, Julien B, Meugnier-Fouilloux E, Vidal H, Naville D[2], Le Magueresse-Battistoni B[2].

[1] These authors contributed equally to the work.

[2] These authors share the last authorship.

Journal of Nutritional Biochemistry.

2017 Jul;45:83-93. doi: 10.1016/j.jnutbio.2017.04.001. PMID : 28433925

Evidence for estrogeno-mimetic effects of a mixture of low-dose pollutants in a model of ovariectomized mice.

Julien B, Pinteur C[1], Vega N[1], Labaronne E, Vidal H, Naville D[2], Le Magueresse-Battistoni B[2]

[1] These authors contributed equally to the work.

[2] These authors share the last authorship.

Environmental Toxicology and Pharmacology.

2018 Jan;57:34-40. doi: 10.1016/j.etap.2017.11.008. PMID : 29175711

Chronic exposure to a pollutant mixture at low doses led to tissue-specific metabolic alterations in male mice fed standard and high-fat high-sucrose diet.

Naville D, Gaillard G, Julien B, Vega N, Pinteur C, Chanon S, Vidal H, Le Magueresse-Battistoni B.

Chemosphere.

2019 Apr;220:1187-1199. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.12.177. PMID: 30722647

Estrogen withdrawal and replacement differentially target liver and adipose tissues in female mice fed a high-fat high-sucrose diet. Impact of a chronic exposure to a low-dose pollutant mixture.

Julien B, Pinteur C[1], Vega N[1], Labaronne E, Vidal H, Naville D, Le Magueresse-Battistoni B

[1] These authors contributed equally to the work.

Journal of Nutritional Biochemistry.

En révision

4 Liste des communications orales et affichées

4.1 Communications orales

24ème réunion de l'association G2L2G – Oullins, France (19/05/2017)

Metabolic effects of a mixture of low-dose pollutants in a mouse model of estrogen deficiency.

22e Journée scientifique de l'EDISS – Villeurbanne, France (12/10/2017)

L'administration chronique d'un mélange de perturbateurs endocriniens à faible dose améliore le métabolisme des souris femelles en situation de déficience en œstrogènes.

4.2 Communications affichées

21e Journée scientifique de l'EDISS – Villeurbanne, France (13/10/2016)

Impacts métaboliques d'un mélange de perturbateurs endocriniens dans un modèle de souris ovariectomisées.

Société Francophone du Diabète – Lille, France (28 au 31/03/2017)

Impacts métaboliques d'un mélange de perturbateurs endocriniens dans un modèle de souris ovariectomisées.

53rd EASD Annual Meeting – Lisbonne, Portugal (11 au 15/09/2017)

Metabolic effects of a mixture of low-dose pollutants in a mouse model of estrogen deficiency.

Introduction

1 Obésité et diabètes : perturbation du métabolisme énergétique

1.1 Généralités

1.1.1 Obésité

L'obésité est définie par l'OMS comme étant une accumulation anormale et excessive de masse grasse qui peut nuire à la santé (4). C'est la maladie de la nutrition la plus fréquente au monde, les personnes souffrant d'obésité étant plus nombreuses que celles en dénutrition. Elle est due à une balance énergétique positive sur le long terme (**Figure 1**). D'un côté les apports énergétiques augmentent; de l'autre, la dépense énergétique totale, composée principalement du métabolisme de base (70%), de l'activité physique et du métabolisme des aliments ou thermogenèse postprandiale, tend à diminuer.

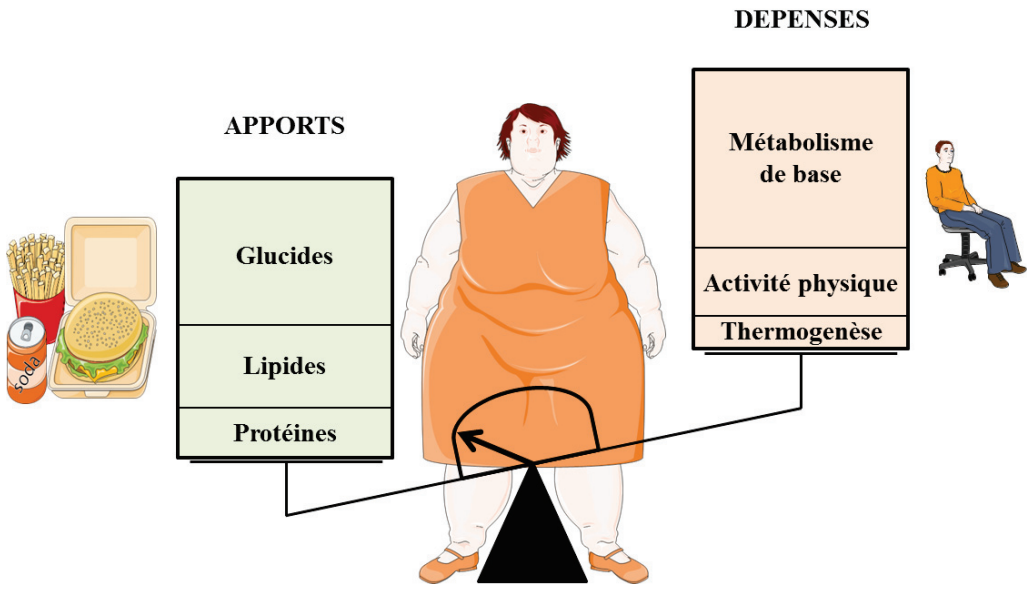


Figure 1 : Schéma de la balance énergétique dans un contexte d'obésité.

L'outil diagnostic le plus utilisé pour évaluer la charge pondérale dans les populations est l'indice de masse corporelle (IMC) représenté par le rapport entre le poids et la taille. Il est exprimé en kg/m² (**Figure 2**).

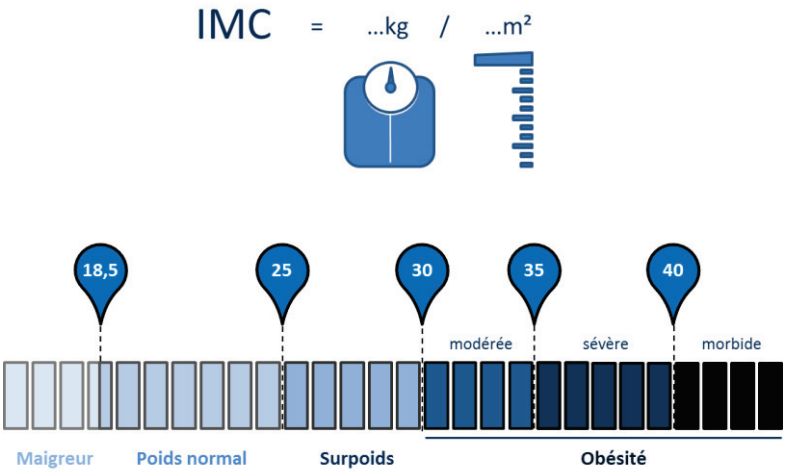


Figure 2 : Classification du poids selon l'indice de masse corporelle (IMC)

Lorsque cet indice est égal ou supérieur à 25, on parle de surpoids. A partir de 30 on parle d'obésité, divisée en plusieurs sous-catégories : modérée, sévère et morbide. Si l'IMC représente un indicateur intéressant pour l'étude de l'évolution de la charge pondérale dans la population générale, cette mesure de l'obésité est imparfaite. Si l'on reprend la définition de l'OMS, il est question d'accumulation de « masse grasse ». Or lorsqu'on regarde de plus près l'équation mathématique de l'IMC, le numérateur (le poids du sujet) ne distingue pas la masse musculaire et la masse grasse. Prenons le cas d'un bodybuilder : l'hypertrophie des muscles squelettiques associée aux exercices physiques entraine un développement accru de la masse musculaire et une fonte de la masse grasse. Pourtant il peut avoir le même IMC qu'une personne obèse, car son poids sera élevé. L'âge affecte également l'IMC puisque les personnes âgées ont tendance à avoir plus de masse grasse et une fonte de la masse musculaire, en comparaison des individus plus jeunes. On parle dans ce cas d'obésité sarcopénique. L'IMC ne prend pas non plus en compte la répartition de la masse grasse, qui est différente en fonction du sexe. Même si en termes quantitatifs, les femmes ont plus de masse grasse que les hommes (20-25% *vs* 10-15%), elles l'accumulent préférentiellement au niveau du bas du corps (fesses, hanche) tandis que chez les hommes, le tissu adipeux va se concentrer plutôt au niveau du ventre. Cette répartition de la masse grasse a une importance fondamentale dans le développement des maladies métaboliques puisque la localisation sous-cutanée du tissu adipeux est plutôt protectrice tandis que la localisation viscérale du tissu adipeux est associée au diabète de type 2 (DT2), à l'hypertension artérielle, à une dyslipidémie et un risque cardiovasculaire.

Par ailleurs, un individu catégorisé comme obèse d'après son IMC peut ne présenter aucune complication de santé, ce qui est le cas pour les obèses en bonne santé métabolique traduit du concept anglais MHO (*Metabolically Healthy Obese*). De même, des individus non obèses selon l'IMC peuvent présenter des caractéristiques métaboliques associées habituellement à l'obésité (**Figure 3**). Ces sujets métaboliquement obèses de poids normal sont appelés MONW (*Metabolically Obese Normal Weight*).

	Phénotype MONW	**Phénotype MHO**
Particularité	Sujets non obèses « métaboliquement anormaux »	Sujets obèses « métaboliquement normaux »
Prévalence	5-10% des sujets non obèses	20-30% des sujets obèses
Physiopathologie	Adiposité intra-abdominale + insulino-résistance	Adiposité sous-cutané périphérique principalement
Pronostic	Risque accru de DT2 et de maladies cardiovasculaires	Risque faible de DT2 et de maladies cardiovasculaires

Figure 3 : Comparatif des phénotypes MONW et MHO (adapté de Beck E., 2009 **(5)**).

D'autres méthodes simples comme la mesure du tour de taille permettent ainsi de mieux se rendre compte de l'adiposité abdominale. En clinique, les valeurs de la circonférence abdominale dans la population caucasienne sont < 80 cm chez la femme et < 94 cm chez l'homme (6). L'obésité viscérale, mais également l'intolérance au glucose, l'insulino-résistance, la dyslipidémie et l'hypertension artérielle font partie des facteurs de risque associés au développement du syndrome métabolique. Ce concept de syndrome métabolique se définit selon les critères du *National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP III) par la présence d'au moins 3 des 5 critères présents dans ce tableau (6) :

Critères	**Femmes**	**Hommes**
Tour de taille (cm)	> 88	> 102
Pression artérielle (mmHg)	≥ 130/85	
Glycémie à jeun (mg/dL)	≥ 100	
Triglycérides plasmatiques (mg/dL)	≥ 150	
Cholestérol HDL (mg/dL)	< 50	< 40

Figure 4 : Critères du NCEP-ATP III associés au syndrome métabolique.

Cette définition a été revue par l'*International Diabetes Federation*. Un tour de taille > 80 cm chez les femmes et > 94 cm chez les hommes devient un paramètre obligatoire auquel doit s'ajouter la présence d'au moins 2 des autres critères indiqués par le NCEP-ATP III, et détaillés dans le tableau précédent (6).

1.1.2 Diabètes

Le diabète est un groupe de maladies métaboliques dont le point commun est l'augmentation du taux de glucose dans le sang. On distingue principalement 2 types de diabète :

Le diabète de type 1 (insulino-dépendant) : Maladie auto-immune responsable de la destruction partielle ou totale des cellules bêta du pancréas, sécrétrices de l'insuline. Il survient généralement chez le sujet jeune et le seul traitement existant est l'insuline par injection pour abaisser la glycémie.

Le diabète de type 2 (DT2) ou diabète sucré (non insulino-dépendant) : Le plus fréquent (90% des diabètes). Contrairement au diabète de type 1, l'insuline est toujours produite par le pancréas, mais en quantité moindre (insulinopénie). Par ailleurs, les cellules répondent moins bien à l'action de l'insuline. On dit qu'elles sont insulino-résistantes. Cet état contribue à augmenter le taux de glucose dans le sang (7). Le DT2 survient généralement chez les adultes approchant la quarantaine et s'accompagne rarement de symptômes, à ses débuts. Il peut alors passer inaperçu pendant plusieurs années avant d'être découvert lors d'un simple dosage du glucose sanguin. Compte tenu du caractère silencieux de la maladie, on estime que 20 à 30% des adultes diabétiques ne sont pas diagnostiqués. Aujourd'hui, l'augmentation de la prévalence du DT2 est liée non seulement au vieillissement de la population, mais également en raison des déséquilibres nutritionnels et d'une plus grande sédentarité, au développement pandémique du DT2 chez les enfants et les adolescents (8).

Les valeurs physiologiques et physiopathologiques de la glycémie

La glycémie est le **taux de glucose dans le sang**. Elle est considérée comme « normale » lorsqu'elle est proche de **1 g/L (5,5 mM) à jeun**. Elle varie de +/- 30% au cours de la journée, augmentant durant plusieurs heures après les repas (état post-prandial), d'où la nécessité de réaliser cette mesure à jeun le matin. Lorsque la glycémie est **< 0,7 g/L (4 mM)**, on parle d'**hypoglycémie**. A l'inverse lorsqu'elle dépasse **1,3 g/L (7 mM)** on parle d'**hyperglycémie**.

Le diabète sucré est une maladie évolutive qui peut être diagnostiquée par une glycémie supérieure à 1,26 g/L (7 mmol/L) après 8 heures de jeûne et réalisée à 2 périodes éloignées dans le temps. A un stade précoce, la montée de la résistance périphérique à l'insuline est compensée par une élévation de la sécrétion de l'insuline par le pancréas, permettant un maintien de la glycémie à des valeurs normales (normoglycémie). Cependant, et progressivement, le pancréas s'épuise et va sécréter de moins en moins d'insuline. L'individu rentre alors dans une phase de prédiabète également appelée intolérance au glucose, qui correspond à une glycémie modérée à jeun supérieure aux valeurs considérées comme normales (> 1,10 g/L ou 6,0 mmol/L) mais inférieure au seuil défini pour le DT2 (< 1,26 g/L ou 7 mmol/L). A long terme, l'installation d'une intolérance au glucose et d'une hyperglycémie représente des facteurs de risque favorisant l'apparition du DT2.

1.1.3 Métabolisme énergétique

Une variable physiologique comme la glycémie est maintenue relativement stable malgré des conditions environnementales changeantes. On sait par exemple que la concentration plasmatique moyenne de glucose est d'environ 1 g/L, mais elle varie tout au long de la journée : elle augmente après un repas pour ensuite revenir au niveau basal au bout de 2 h par des mécanismes régulateurs sous contrôle hormonal et regroupés sous le terme de métabolisme. Celui-ci comprend la synthèse (anabolisme) et la dégradation (catabolisme) de molécules organiques nécessaires au maintien de la fonction et de la structure des cellules, générant de l'énergie chimique sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) utilisée pour le fonctionnement cellulaire. Dans le cas du métabolisme énergétique, les macromolécules présentes dans l'alimentation (glucides, lipides et protides) vont être scindées en plus petites molécules (glucose, acides gras et acides aminés) capables de traverser la paroi intestinale et

rejoindre leurs cellules cibles *via* la circulation sanguine et lymphatique pour être utilisées directement par la cellule et produire l'énergie nécessaire à son fonctionnement, ou être stockées en cas d'excès. Chez l'homme, ce sont principalement le glucose et les acides gras qui fournissent l'énergie nécessaire au bon fonctionnement des cellules. Le métabolisme protidique ne sera pas traité dans ce manuscrit de thèse.

Tout au long de la journée, l'organisme alterne entre des phases anaboliques et cataboliques rythmées par les repas, appelées respectivement phases absorptives et post-absorptives.

1.1.3.1 *Phase absorptive*

Les phases absorptives suivent immédiatement le repas et durent environ 4 heures. Le glucose absorbé par les cellules permet dans un premier temps de produire de l'énergie *via* la **glycolyse** et le cycle de Krebs (**Figure 5**). L'excédent est stocké sous forme de glycogène dans le muscle et le foie par **glycogénogenèse**. Les acides gras constituent une source énergétique importante pour l'organisme puisqu'à quantité équivalente, ils stockent 2 fois plus d'énergie que le glucose (9 kcal par gramme de lipides contre 4 kcal par gramme de glucides). Ces acides gras majoritairement présents sous la forme de triglycérides (TG) sont transportés dans la circulation sanguine par des lipoprotéines comme les chylomicrons formés au niveau de l'intestin ou les *very low density lipoproteins* (VLDL) produites par le foie. Les TG circulants sont ensuite hydrolysés en acides gras non estérifiés par l'action de la *lipoprotein lipase* (LPL). Après être rentrés dans la cellule *via* leur transporteur, les acides gras vont subir une estérification par fixation d'une molécule de glycérol pour reformer des TG, forme finale de stockage énergétique. Chez la souris, et, dans une moindre mesure, chez l'homme, les acides gras peuvent directement être synthétisés dans les adipocytes et les hépatocytes à partir du glucose. On parle alors de **lipogenèse *de novo***.

L'insuline joue un rôle essentiel dans les évènements associés à la phase absorptive. L'insuline est une hormone anabolisante produite par les cellules β des îlots pancréatiques en réponse à des concentrations plasmatiques élevées de glucose, par exemple à la suite d'un repas (glycémie postprandiale). Après ingestion d'un repas, l'insuline va avoir une action hypoglycémiante stimulant par exemple la captation du glucose dans le muscle ainsi que son utilisation.

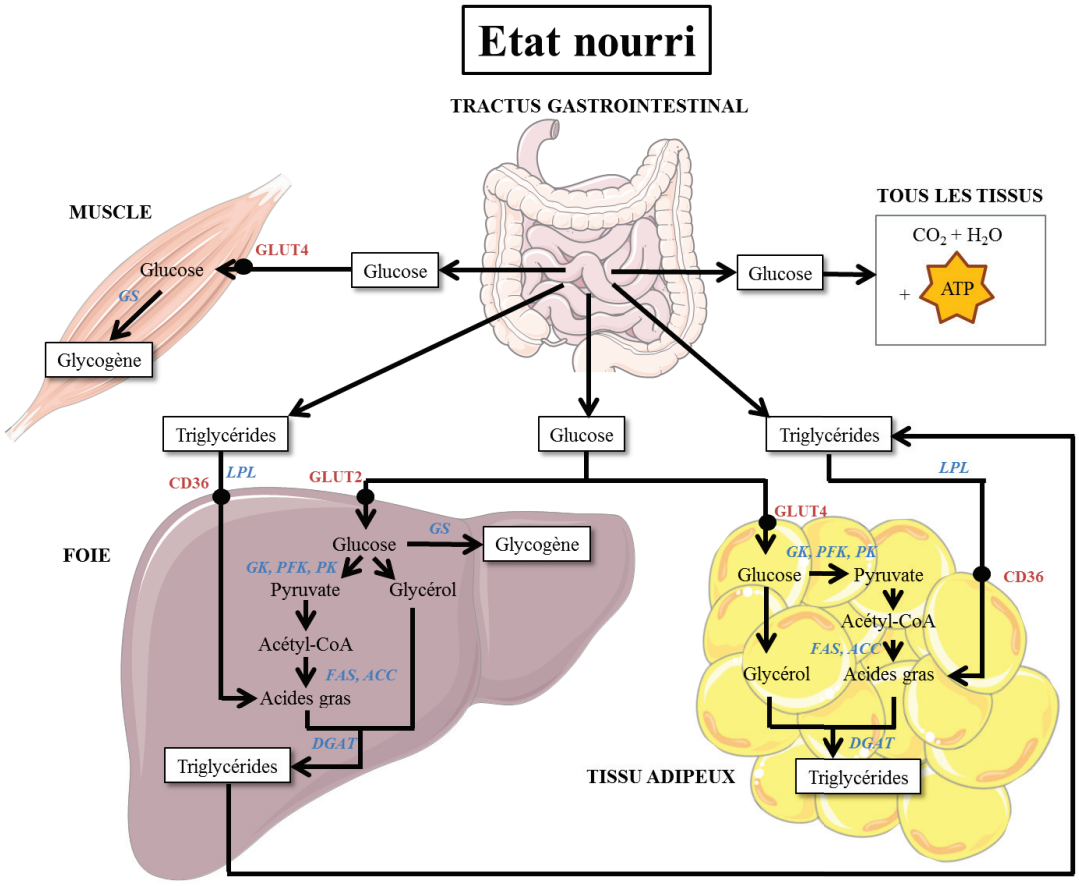


Figure 5 : **Régulation du métabolisme énergétique en phase absorptive**. Les transporteurs du glucose et des acides gras sont représentés en rouge. Les enzymes principales contrôlant les voies métaboliques sont notées en italique (bleu). ACC : Acetyl-CoA carboxylase, CD36 : Cluster of differentiation 36, DGAT : Diglyceride acyltransferase, FAS : Fatty acid synthase, GK : Glucokinase, GLUT : Glucose transporter, GS : Glycogen synthase, LPL : Lipoprotein lipase, PFK : Phosphofructokinase, PK : Pyruvate kinase.

1.1.3.2 *Phase post-absorptive*

Les phases post-absorptives permettent d'assurer, dans un premier temps, le maintien de la glycémie par des réactions enzymatiques produisant du glucose soit directement à partir de glycogène dans le foie (**glycogénolyse**) ; soit indirectement dans le muscle par la formation de molécules intermédiaires comme le lactate et le pyruvate (**Figure 6**). Dans le tissu adipeux la **lipolyse** permet l'hydrolyse des TG en acides gras et glycérol. Ce dernier peut ensuite être transporté avec le lactate et le pyruvate dans le foie pour produire du glucose par **néoglucogenèse**. Lorsque l'organisme n'arrive plus à fournir du glucose aux cellules par ces différentes voies métaboliques, le maintien de la glycémie passe par la conversion des acides gras en acétyl-CoA (**β-oxydation**) puis en corps cétoniques utilisables par les tissus gluco-dépendants comme le cerveau. L'un des acteurs clés de cette phase catabolique est le glucagon produit par les cellules α des îlots pancréatiques. Hormone antagoniste de l'insuline,

le glucagon tend à élever la glycémie vers sa valeur physiologique par ses propriétés hyperglycémiantes.

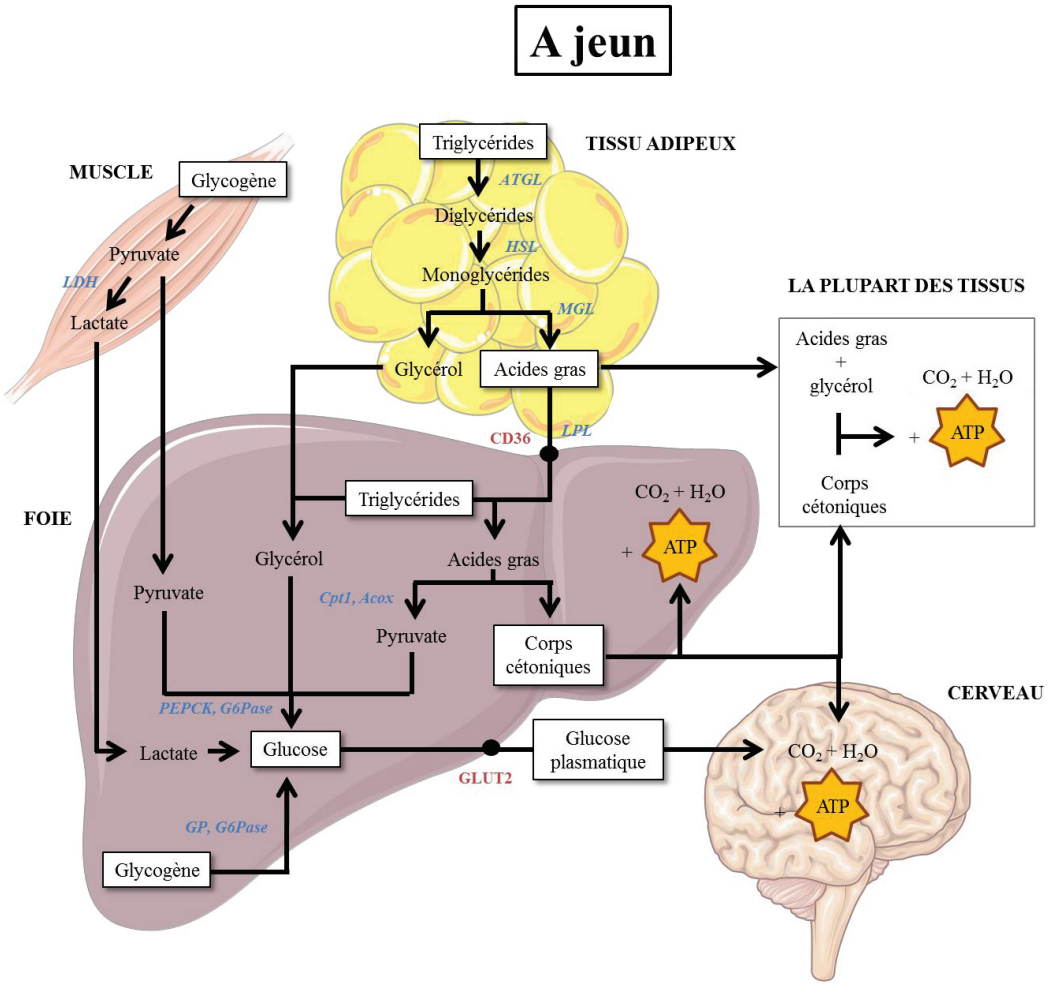


Figure 6 : **Régulation du métabolisme énergétique en phase post-absorptive**. Les transporteurs du glucose et des acides gras sont représentés en rouge. Les enzymes principales contrôlant les voies métaboliques sont notées en italique (bleu). Acox : Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase, ATGL : Adipose triglyceride lipase, Cpt1 : Carnitine palmitoyltransferase I, G6Pase : Glucose-6-phosphatase, GP : Glycogen Phosphorylase, HSL : Hormone Sensitive Lipase, LDH : Lactate dehydrogenase, LPL : Lipoprotein lipase, MGL : Monoacylglycerol lipase, PEPCK : Phosphoenolpyruvate Carboxykinase.

1.1.3.3 *Régulation hormonale du métabolisme énergétique*

Le système endocrinien joue un rôle central dans la communication interne entre les tissus. Il comprend l'ensemble des glandes internes dites endocrines qui sécrètent directement des hormones. Les hormones sont des messagers chimiques qui gagnent le sang pour être véhiculés jusqu'aux cellules cibles qui expriment des récepteurs spécifiques aux hormones. La liaison aux récepteurs va initier des voies de signalisation conduisant aux différents effets métaboliques indiqués dans la **Figure 7**.

Tissus endocrines	Hormones	Effets métaboliques
Pancréas	Insuline	↓ Néoglucogenèse / ↓ Glycogénolyse / ↑ Glycogénogenèse
		↓ Lipolyse/ ↑ Lipogenèse
	Glucagon	↑ Néoglucogenèse / ↑ Glycogénolyse / ↓ Glycogénogenèse
		↑ Lipolyse/ ↓ Lipogenèse
Tissu adipeux	Adiponectine	↑ Utilisation du glucose / ↓ Néoglucogenèse
		↑ β-oxydation /↓ Lipogenèse
	Leptine	↑ Dépense énergétique
Intestin	Incrétines (GLP-1 / GIP)	↑ Insuline / ↓ Glucagon
		↑ Prolifération / ↓ Apoptose (cellules β)
Thyroïde	Hormones thyroïdiennes (T_3/T_4)	↑ Thermogenèse / ↑ Dépense énergétique
		↑ β-oxydation / ↑ Lipolyse
		↑ Prolifération (cellules β)
		↑ Néoglucogenèse
Foie	Adropine	↓ Lipogenèse
	FGF21	↑ Absorption + stockage du glucose
		↑ Thermogenèse / ↑ Dépense énergétique

Figure 7 : Liste non exhaustive des hormones régulant le métabolisme énergétique.

1.2 L'insuline

1.2.1 La sécrétion de l'insuline

Au niveau du pancréas, le glucose entre dans la cellule β par la protéine GLUT2 de la famille des transporteurs membranaires au glucose (**Figure 8**). GLUT2 étant sensible aux variations de glycémie, il joue le rôle de détecteur ou « senseur » du glucose. Une fois dans la cellule, le glucose est utilisé pour produire de l'énergie au niveau des mitochondries, ce qui a pour conséquence l'augmentation du ratio ATP/ADP. Ceci entraine la fermeture de canaux potassiques, qui empêche les ions K^+ de sortir de la cellule. L'accumulation d'ions positifs sur la face interne de la membrane plasmique engendre une dépolarisation membranaire favorisant l'ouverture de canaux calciques. L'entrée massive d'ions Ca^{2+} déclenche la libération d'insuline dans la circulation sanguine, qui était stockée dans des granules du cytoplasme.

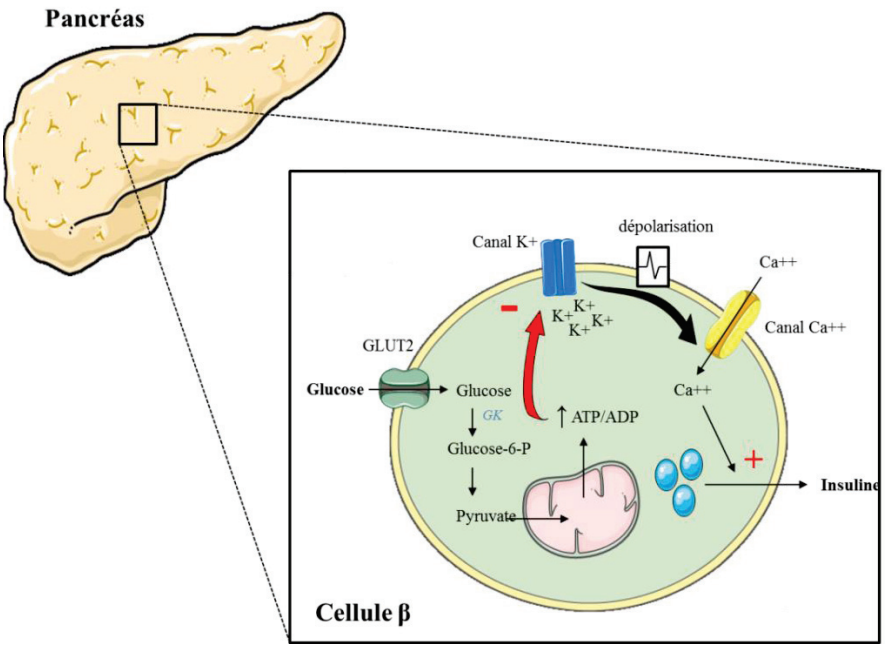


Figure 8 : Mécanisme de sécrétion de l'insuline par les cellules β pancréatiques.

Lorsque la glycémie baisse, la cellule sensible à l'insuline va internaliser les transporteurs GLUT par endocytose pour les stocker dans des compartiments intracellulaires afin de limiter l'absorption du glucose. Au contraire en cas d'hyperglycémie, les vésicules contenant les GLUT vont fusionner avec la membrane, les rendant accessibles pour favoriser l'absorption du glucose en excès (**Figure 9**).

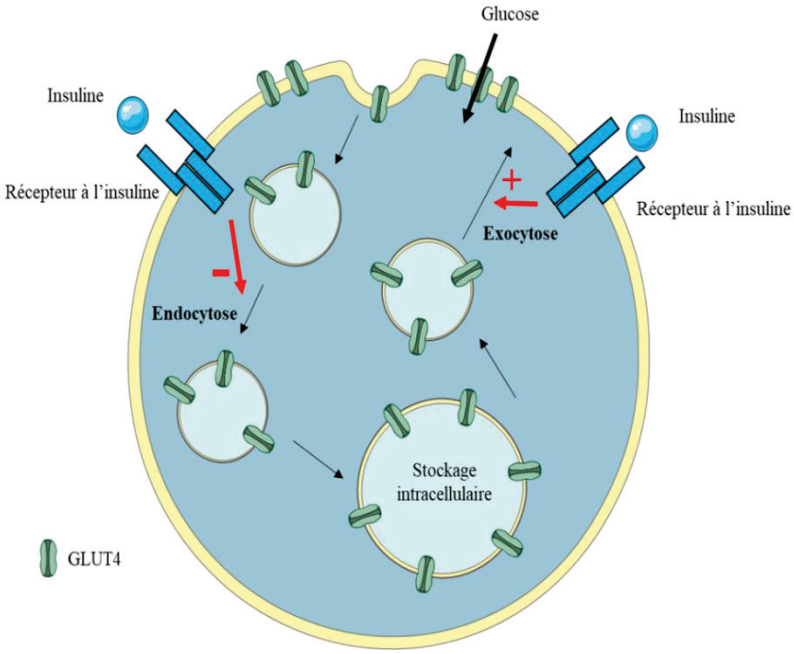


Figure 9 : Effet de l'insuline sur le transport du glucose dans le muscle squelettique et le tissu adipeux.

1.2.2 La signalisation moléculaire de l'insuline

Après fixation de l'insuline à son récepteur (**Figure 10**), une cascade de signalisation intracellulaire est initiée. Celle-ci débute par l'autophosphorylation du récepteur sur des résidus tyrosine intracellulaires. Ces résidus phosphorylés sont ensuite reconnus par le domaine *phosphotyrosine binding* (PTB) du substrat du récepteur à l'insuline (IRS), protéine fixée à la face interne de la membrane plasmique par son domaine *pleckstrin homology* (PH). Il existe 3 isoformes d'IRS : IRS1 exprimé dans le muscle et le tissu adipeux, IRS2 dans le foie et IRS3 dans le tissu adipeux. Les protéines IRS phosphorylées sont à leur tour reconnues par les domaines *src homology 2* (SH2) de la *phosphatidyl-inositol 3 kinase* (PI3K). Une fois activée, PI3K va entrainer la phosphorylation des phosphoinositides membranaires en position 3 (conversion PIP2 en PIP3), créant ainsi des sites de reconnaissance pour d'autres kinases comme la protéine kinase B (PKB/Akt) et la *3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1/2* (PDK1/2). La phosphorylation d'Akt sur la tyrosine T308 et la sérine S473 respectivement par PDK1 et PDK2 aboutit à la translocation membranaire de vésicules contenant les transporteurs du glucose (GLUT4 dans le muscle et le tissu adipeux, GLUT2 dans le foie et le pancréas) facilitant son absorption.

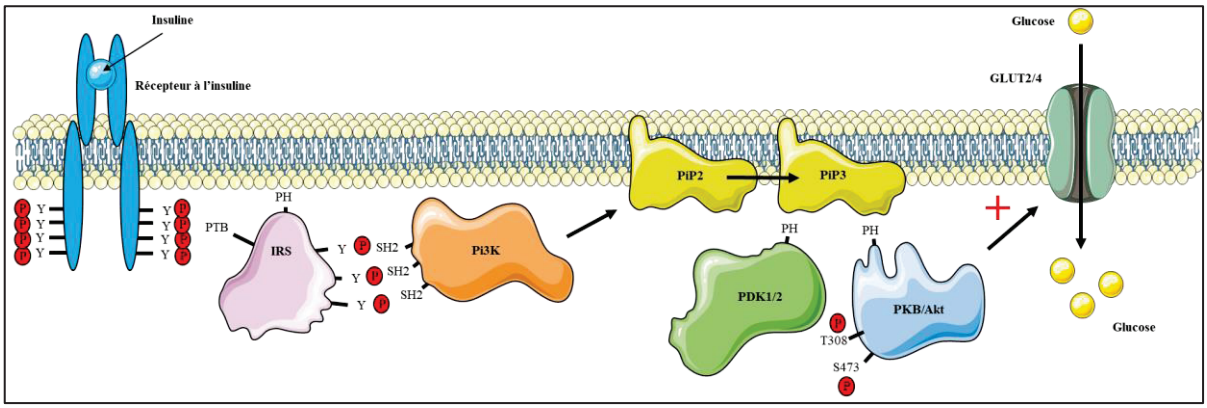


Figure 10 : Mécanismes moléculaires d'action de l'insuline au niveau des tissus cibles impliqués dans l'absorption du glucose.

1.2.2.1 *Mécanismes d'action de l'insuline dans le muscle*

Le muscle squelettique est un contributeur majeur de la dépense énergétique totale. Représentant environ 45% de la masse corporelle d'un homme moyen, il est responsable de près de 80% de l'absorption du glucose induite par l'insuline (9). Par conséquent, la réponse à l'insuline dans ce tissu est importante pour la régulation de la sensibilité à l'insuline du corps

entier. Dans le muscle, le glucose traverse la membrane (sarcolemme) *via* GLUT4. Il est ensuite converti en G6P par l'*hexokinase II* (HK II), puis en UDP-glucose. La conversion de l'UDP-glucose en glycogène est régie par l'activation de la *Glycogen synthase* (GS). A l'état basal, GS est inactivée par l'activité kinase de la *Glycogen synthase kinase 3* (GSK3). Lorsque l'insuline se fixe sur son récepteur, l'activation d'Akt permet la phosphorylation de GSK3 qui ne peut plus alors phosphoryler GS. La forme non phosphorylée de GS est la forme active, ce qui permet la synthèse de glycogène (**Figure 11**). L'activation d'Akt permet également la phosphorylation d'*Akt Substrate of 160 kDa* (AS160) qui déclenche la translocation de GLUT4 depuis les vésicules intracellulaires jusqu'à la membrane plasmique, permettant l'absorption du glucose.

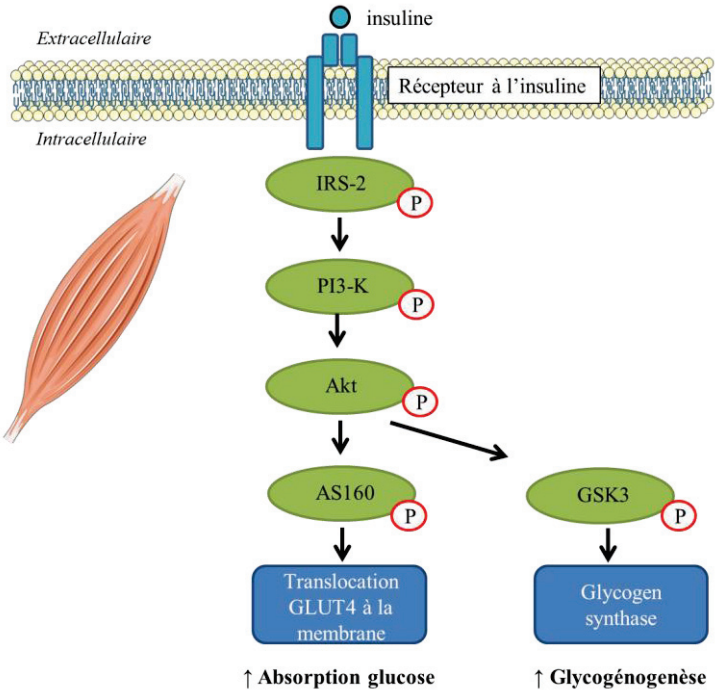


Figure 11 : Mécanismes moléculaires de régulation du métabolisme glucidique par l'insuline dans le muscle.

1.2.2.2 *Mécanismes d'action de l'insuline dans le foie*

Dans le foie, l'insuline s'oppose à la **néoglucogenèse**. Les mécanismes impliquent la phosphorylation du facteur de transcription *Forkhead box O1* (FOXO1), qui se retrouve alors séquestré dans le cytoplasme, et qui va subir une série d'ubiquitinations conduisant à sa dégradation par la voie du protéasome (**Figure 12**). Cette étape de phosphorylation bloque la translocation nucléaire de FOXO1 et l'activation des gènes de la néoglucogenèse (PEPCK, G6Pase) qui possèdent des éléments de réponse à FOXO1 dans leur promoteur (10).

L'insuline stimule en parallèle la synthèse de glycogène par activation d'Akt, entrainant l'inhibition de GSK3 et l'activation de GS. L'activation d'Akt permet aussi l'activation du facteur de transcription *sterol regulatory element-binding protein-1c* (SREBP-1c) impliqué dans l'expression des gènes clés de la **lipogenèse *de novo*** (*fatty acid synthase* codant FAS et *acetyl-CoA carboxylase alpha* ou *Acaca* codant ACC). Ce mécanisme moléculaire impliquerait l'activation d'un complexe de protéines kinases nommé *mammalian target of rapamycin complex 1* (mTORC1) en amont de SREBP-1c, puisque l'inhibition de mTORC1 par la rapamycine bloque l'action d'Akt sur SREBP-1c (11).

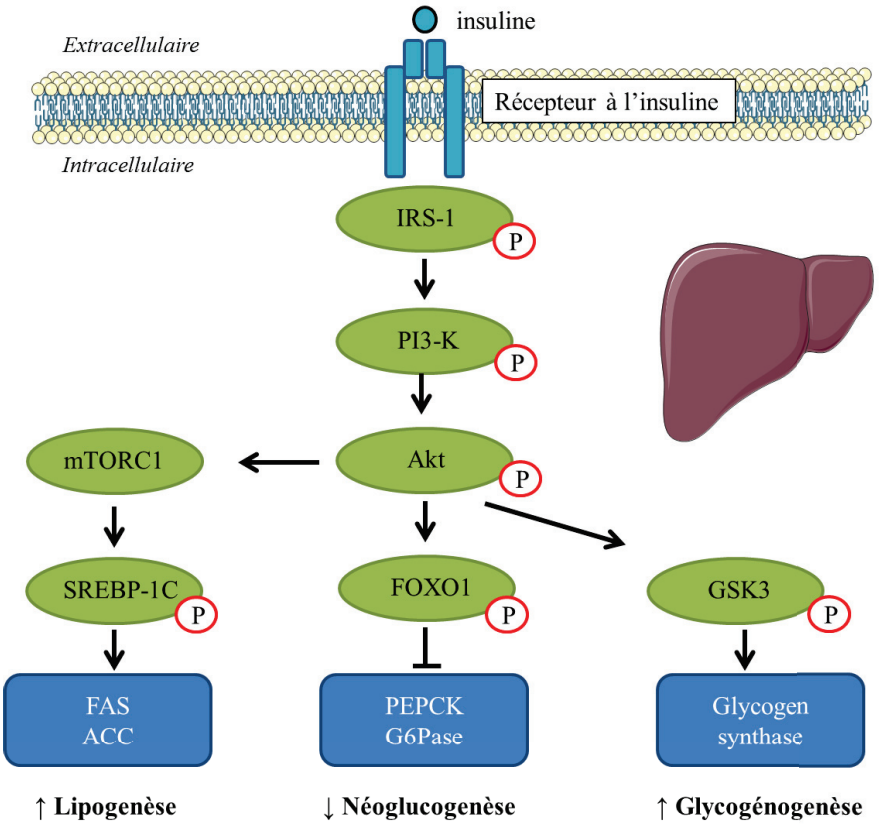


Figure 12 : Mécanismes moléculaires de régulation du métabolisme glucidique par l'insuline dans le foie (adapté de Kim OK., 2015 (12)).

1.2.2.3 *Mécanismes d'action de l'insuline dans le tissu adipeux*

Dans le tissu adipeux, l'insuline stimule l'absorption du glucose par recrutement des transporteurs GLUT4 à la membrane. L'insuline a également une action antilipolytique. La lipolyse est stimulée par les catécholamines qui activent les récepteur β1/2-adrénergiques. Ces récepteurs de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont associés à une protéine Gαs à l'origine d'une activation en cascade de seconds messagers dont l'adénylate

cyclase, l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) puis la Protéine Kinase A (PKA). La PKA activée stimule l'activité de deux lipases - la lipase hormono-sensible (HSL) et l'*adipose triglyceride lipase* (ATGL) - qui dégradent respectivement les diglycérides et TG en acides gras. L'insuline, par activation d'Akt, active la phosphodiestérase 3B (PDE3B) qui convertit l'AMPc en 5'AMP, empêchant l'activation de la PKA et donc la lipolyse (**Figure 13**). L'insuline stimule également la **lipogenèse** *via* l'expression de la lipoprotéine lipase (LPL). Cette enzyme permet l'hydrolyse des TG circulants en acides gras libres qui sont ensuite absorbés par les adipocytes pour reformer des TG par estérification avec une molécule de glycérol.

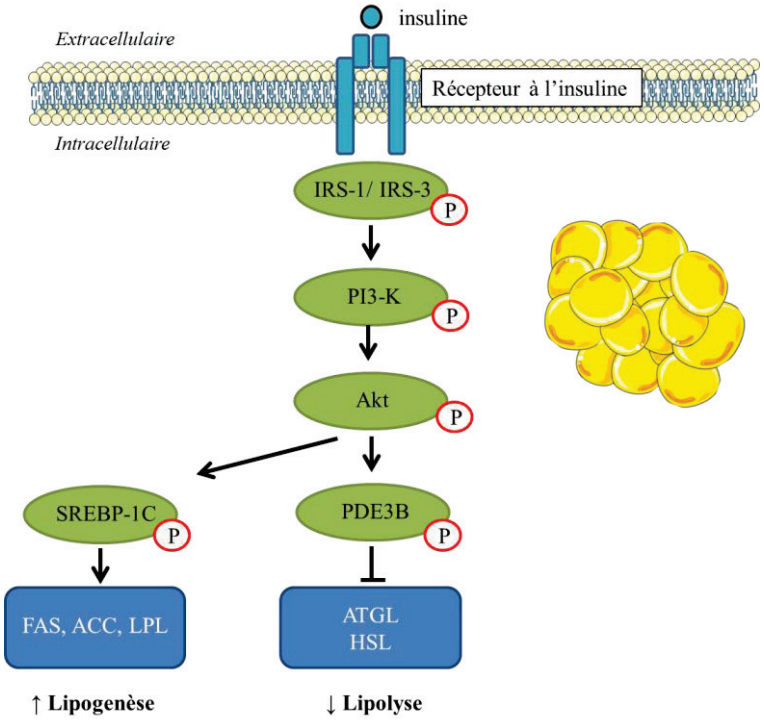


Figure 13 : Mécanismes moléculaires de régulation du métabolisme glucidique par l'insuline dans le tissu adipeux.

1.3 L'insulino-résistance

1.3.1 Qu'est-ce que l'insulino-résistance ?

Une caractéristique des maladies métaboliques et, en particulier au DT2, est la perte de sensibilité des tissus à l'insuline et le dysfonctionnement de la cellule β pancréatique produisant l'insuline nécessaire au maintien de la glycémie. Cette incapacité des tissus métaboliques à répondre à des niveaux physiologiques d'insuline plasmatique définit l'insulino-résistance. L'obésité est l'un des facteurs de risque les plus connus d'apparition de

l'insulino-résistance et du DT2 puisqu'environ 80% des individus obèses sont insulino-résistants.

1.3.2 Les outils de mesure de l'insulino-résistance

Il existe un certain nombre d'outils permettant de mesurer la sensibilité à l'insuline *in vitro* et *in vivo* dans un organisme entier. Voici quelques exemples couramment utilisés en routine en laboratoire et en clinique :

- On peut mesurer l'insulino-résistance *in vitro* en utilisant des lignées d'hépatocytes, de cellules pancréatiques, d'adipocytes ou d'autres cellules sensibles à l'insuline. Ceci permet d'analyser la cascade de signalisation après une stimulation par l'insuline. Ainsi, le ratio d'expression entre la forme phosphorylée et la forme totale d'Akt (**Figure 13**) représente un bon indicateur de la sensibilité des cellules à l'insuline.
- En clinique, la mesure qualifiée de « gold standard » est la technique du clamp euglycémique hyperinsulinémique. Son principe repose sur la perfusion d'insuline à débit constant pour induire un hyperinsulinisme couplé à une perfusion obligatoire de glucose dans le but de maintenir une glycémie constante. Si la production hépatique de glucose est inhibée par la dose d'insuline administrée, le débit de glucose est proportionnel à la sensibilité à l'insuline. Cette méthode est cependant lourde à mettre en place, coûteuse, et par conséquent non pratique pour une manipulation de routine. Elle est aussi utilisée en expérimentation animale.
- D'autres outils de mesure ont été développés pour estimer la sensibilité à l'insuline *in vivo* avec l'utilisation d'index dont le plus utilisé et le mieux validé est l'*Homeostasis Model Assessmnent of Insulin Resistance* (HOMA-IR). Il permet, par la mesure de la concentration de glucose et d'insuline à jeun, d'évaluer l'insulino-résistance au travers de l'équation :

$$"HOMA - IR" = \frac{insuline\ (mU/L) \times glucose(mmol/L)}{22{,}5}$$

Cette méthode de mesure a l'avantage d'être rapide et simple à mettre en place en plus d'être peu coûteuse, ce qui en fait une méthode utilisée fréquemment en clinique pour évaluer l'insulino-résistance.

1.3.3 Les conséquences de l'insulino-résistance sur les tissus

1.3.3.1 *Tissu adipeux et insulino-résistance*

La lipolyse basale du tissu adipeux est élevée dans l'obésité (13) et étroitement associée à l'insulino-résistance (14). En effet, le tissu adipeux viscéral communiquant avec le foie par la veine porte, la libération des acides gras libres dans le sang va contribuer directement à la stéatose hépatique. Par ailleurs, l'augmentation de la lipolyse favorise la résistance hépatique à l'insuline en augmentant la néoglucogenèse (**Figure 14**). Dans un premier temps, la lipolyse augmente la distribution d'acides gras au foie, conduisant à l'augmentation de l'acétyl-CoA qui active la pyruvate carboxylase (PC). Cette enzyme est responsable de la conversion du pyruvate en oxaloacétate qui sera converti in fine en glucose par l'action d'autres enzymes clés comme la PEPCK et la G6Pase. Dans un second temps, la lipolyse augmente la distribution hépatique du glycérol, qui favorise la production de glucose.

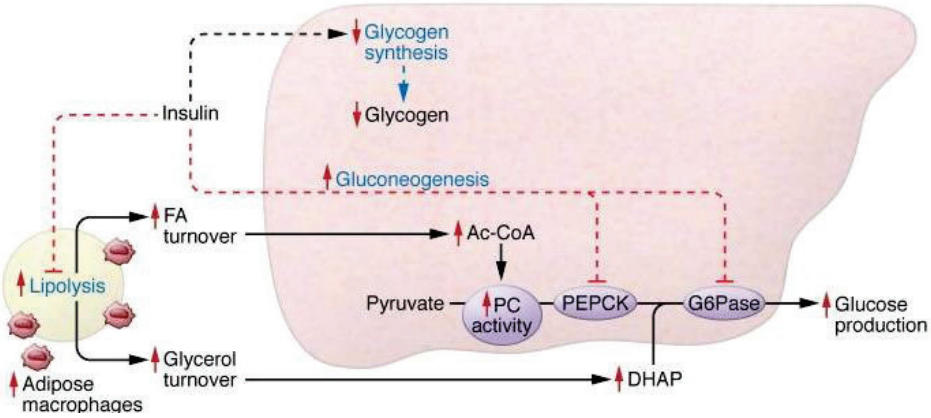


Figure 14 : Dérégulation de la signalisation de l'insuline dans le foie en état d'insulino-résistance (d'après Samuel VT., 2016 (15)).

Il a été observé qu'après une perte de poids induite par une chirurgie bariatrique, les personnes obèses ayant la meilleure récupération de leur sensibilité à l'insuline sont celles qui présentent la plus forte baisse de la lipolyse basale (14). Ceci suggère que le dérèglement de la lipolyse basale des adipocytes pourrait être un évènement primaire dans l'émergence de l'insulino-résistance. D'autres évènements ont été décrits :

<u>Accumulation ectopique de lipides</u>

La **lipotoxicité** correspond aux effets délétères induits par une accumulation ectopique de lipides. Par exemple, l'infusion de lipides chez des personnes saines minces provoque une

augmentation transitoire du contenu en diglycérides dans le muscle squelettique, ce qui active la Protéine Kinase C theta (PKCθ) qui vient inhiber l'expression d'IRS-1, participant au développement de l'insulino-résistance (16). Cette relation entre accumulation de diglycérides et activation de PKCθ est également suggérée dans une étude analysant le foie de patients insulino-résistants souffrant de stéatose hépatique non alcoolique (17). De plus, l'augmentation des acides gras non estérifiés et du glycérol circulants peuvent aussi servir de précurseurs pour la néoglucogenèse et aggraver l'hyperglycémie chez la souris (18). Par ailleurs, dans de nombreux modèles de déficience en lipase, il a été rapporté qu'une réduction du contenu en lipides dans le foie et le muscle est contemporaine d'une amélioration de la sensibilité à l'insuline (14,18,19).

Profil sécrétoire des adipocytes

La lipolyse peut également moduler le sécrétome, c'est-à-dire l'ensemble des protéines sécrétées par les adipocytes. Jusqu'à la découverte de la leptine en 1994, le tissu adipeux était considéré comme un organe passif de stockage de l'énergie sous forme de TG. Depuis, il a été démontré que le tissu adipeux est un organe endocrine libérant des adipokines (20) capables d'agir à distance sur d'autres organes tels que le muscle et le foie. Dans ce contexte, Ertunc *et al.* ont récemment démontré une relation directe entre la lipolyse et la sécrétion de *fatty acid binding protein 4* (FABP4) par l'adipocyte, une adipokine dont la surexpression favorise la néoglucogenèse et l'insulino-résistance (21). La dérégulation de l'expression d'autres adipokines telles que la leptine et l'adiponectine participe également à la physiopathologie de l'insulino-résistance.

La leptine est une adipokine essentielle dans la régulation de l'homéostasie énergétique par son action de régulation centrale de la prise alimentaire au niveau du noyau arqué de l'hypothalamus. Ses concentrations dans le tissu adipeux et le plasma sont corrélées aux stocks énergétiques, de sorte qu'elle augmente dans le cas de l'obésité et diminue pendant un jeûne. Les niveaux élevés de leptine sont également associés à une insulino-résistance et un DT2. En effet, une étude clinique de 2005 montre des niveaux de leptine plus élevés chez des personnes diabétiques en comparaison des non-diabétiques, corrélés à l'index d'insulino-résistance (HOMA-IR), au ratio taille/hanche et à l'inflammation (22). La déficience congénitale en leptine chez les modèles animaux (souris *ob/ob*) est associée à une obésité généralement accompagnée d'une insulino-résistance, d'une hyperphagie, d'une altération de

la thermogenèse, d'une hyperlipidémie et d'un hypogonadisme central, qui peuvent être corrigés par l'administration de leptine exogène (23).

L'adiponectine est une hormone dont la concentration plasmatique est inversement proportionnelle à l'importance de la masse grasse, et positivement corrélée à la sensibilité à l'insuline (24–26). Ses niveaux sériques sont plus importants chez les femmes. L'adiponectine exerce ses effets par fixation à deux récepteurs : AdipoR1 et AdipoR2 (**Figure 15**). AdipoR1 s'exprime plutôt dans le muscle et AdipoR2 dans le foie. La fixation de l'adiponectine sur AdipoR1 dans le muscle squelettique initie l'augmentation de l'expression de l'AMPK qui permet l'utilisation du glucose et l'oxydation des acides gras (27,28). Elle réduit également l'expression des gènes codant pour des enzymes de la néoglucogenèse (PEPCK et G6Pase) et l'expression de gènes codant pour des molécules impliquées dans la lipogenèse dont le facteur de transcription SREBP-1c. La fixation de l'adiponectine à AdipoR2 dans le foie conduit à l'augmentation de l'expression du gène codant PPARα et ses gènes cibles, au nombre desquels *Acox1* et *Ucp2* qui possèdent des éléments de réponse aux PPAR dans leur région promotrice, l'ensemble contribuant à l'augmentation de la combustion des acides gras et de la consommation énergétique.

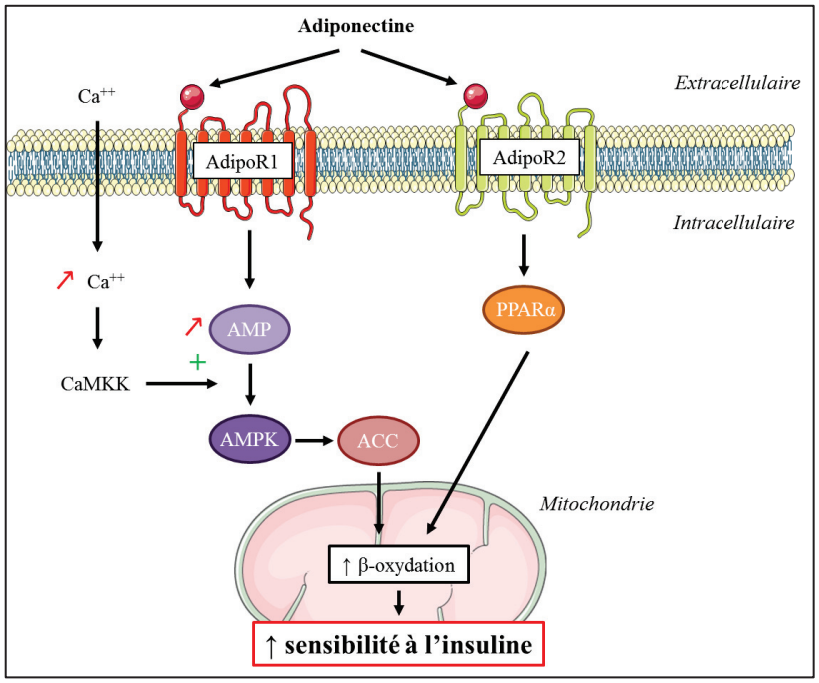


Figure 15 : **Signalisation intracellulaire de l'adiponectine au niveau du foie**. In fine, la fixation de l'adiponectine sur ses récepteurs réduit la stéatose hépatique, contribuant à améliorer la sensibilité périphérique à l'insuline.

De nombreuses études cliniques montrent une corrélation inverse entre les niveaux d'adiponectine et l'insulino-résistance (29–33).

Afin de mieux comprendre l'importance des récepteurs à l'adiponectine dans la régulation de l'insulino-résistance, Bjursel et ses collaborateurs ont développé des modèles de souris déficientes pour les récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 (34). Les souris déficientes pour AdipoR1 (AdipoR1$^{-/-}$) présentent une adiposité accrue associée à une diminution de la tolérance au glucose, de l'activité locomotrice spontanée et de la dépense énergétique. A l'inverse, les souris AdipoR2$^{-/-}$, en plus d'être maigres et résistantes à l'obésité induite par un régime alimentaire riche en graisses, présentent une amélioration de la tolérance au glucose, de l'activité locomotrice spontanée et de la dépense énergétique, avec en plus une réduction du taux de cholestérol plasmatique.

AdipoR1 et AdipoR2 sont également moins exprimés *in vivo* dans le muscle et le tissu adipeux de souris insulino-résistantes (35), mais aussi *in vitro* dans des hépatocytes et des myocytes cultivés en présence d'insuline (modèle d'hyperinsulinémie).

Dans un modèle génétique d'obésité chez la souris n'exprimant pas le récepteur à la leptine (souris *db/db* ou *LR* $^{-/-}$), l'expression des récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 diminue dans le foie (36). L'introduction d'adénovirus exprimant ces récepteurs chez ces souris réduit la production hépatique de glucose et augmente le taux d'infusion du glucose au cours du clamp euglycémique hyperinsulinémique, indiquant une amélioration de la sensibilité à l'insuline.

Les niveaux sériques de leptine et d'adiponectine servent de biomarqueurs de l'insulino-résistance (37,38). Par ailleurs, l'étude de cohorte menée par Mirza et ses collaborateurs a montré une forte corrélation entre le ratio adiponectine/leptine et le syndrome métabolique. Cette corrélation, bien que plus faible, était également présente lorsque les 2 adipokines étaient considérées séparément.

Inflammation à bas bruit

L'obésité est considérée comme un état inflammatoire chronique évoluant à bas bruit. Ce concept propose que le tissu adipeux sécrète des médiateurs de l'inflammation, dont font partie les cytokines, dans la circulation sanguine de manière modérée mais chronique. Ces cytokines joueraient un rôle central dans le développement de l'insulino-résistance (39). Ainsi, Hotamisligil *et al.* ont démontré dans leur étude princeps que le traitement d'adipocytes

murins par la cytokine *tumor necrosis factor-α* (TNF-α) peut aggraver l'insulino-résistance (40). A l'inverse, une déficience pour TNF-α chez des souris rendues obèses génétiquement (*ob/ob*) ou par l'alimentation améliore significativement la sensibilité à l'insuline (41).

Dans le tissu adipeux insulino-résistant, TNF-α perturbe la signalisation de l'insuline en inactivant IRS-1, soit par inhibition de la phosphorylation des résidus tyrosines présents sur IRS-1, soit en diminuant l'expression d'IRS-1 dans les adipocytes (42). De plus, TNF-α augmente la lipolyse basale par réduction de l'expression des périlipines, protéines localisées à la surface des gouttelettes lipidiques des adipocytes et protégeant les TG de l'hydrolyse par HSL (42). Ensemble, ces évènements vont exacerber l'accumulation ectopique de lipides.

Cet état inflammatoire entretenu par l'obésité favorise le recrutement de cellules immunitaires dans le tissu adipeux viscéral. Parmi elles, on retrouve les macrophages. Ces cellules immunitaires sont capables de se regrouper autour des adipocytes morts afin de former des structures en forme de couronne (crown-like structure) permettant leur élimination par phagocytose. De plus, les macrophages sont des cellules ayant une forte plasticité. En effet, selon les *stimuli* qu'ils reçoivent, ils peuvent aussi bien présenter un phénotype pro-inflammatoire qu'anti-inflammatoire, qualifiés respectivement de phénotype M1 et M2. L'obésité, *via* l'abondance d'acides gras libres et de facteurs inflammatoires dans le tissu adipeux, favorise la polarisation des macrophages vers le type M1 (43), qui sécrètent TNF-α, IL-6 et monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Ces molécules inflammatoires vont à leur tour exacerber l'inflammation en activant le recrutement et la polarisation d'autres macrophages M2 vers le phénotype M1, créant un cercle vicieux d'amplification de l'inflammation. Dans le tissu adipeux, les deux types de macrophages sont présents (44) mais c'est le déséquilibre entre ces deux populations en faveur du type M1 qui caractérise l'inflammation médiée par l'obésité.

Dans le tissu adipeux de souris génétiquement obèses et soumises à un régime gras, Xu *et al.* ont remarqué une augmentation de l'expression de gènes spécifiques aux macrophages dont MCP-1 (45). Dans l'obésité, les adipocytes hypertrophiés sécrètent MCP-1 qui attire des cellules immunitaires présentant son récepteur (CCR2) dans le tissu adipeux, amplifiant l'inflammation. De plus, la surexpression de MCP-1 dans le tissu adipeux augmente le recrutement de macrophages et contribue à exacerber l'insulino-résistance induite par l'obésité (46,47).

1.3.3.2 *Foie et insulino-résistance*

Un foie insulino-résistant est un foie qui ne régule plus la néoglucogenèse et qui continue à avoir une action lipogénique *via* SREBP-1C (**Figure 16**). Dans des modèles de rongeurs insulino-résistants, les niveaux nucléaires de SREBP-1C sont extrêmement élevés, ce qui accélère la synthèse d'acides gras et l'accumulation de TG dans le foie. Les TG en excès sont ensuite sécrétés par les VLDL, augmentant leurs niveaux plasmatiques. Les acides gras dérivés de ces TG empirent l'état d'insulino-résistance en s'accumulant dans le muscle et le tissu adipeux, ce qui participe à la triade hyperglycémie, hyperinsulinémie et hypertriglycéridémie (10).

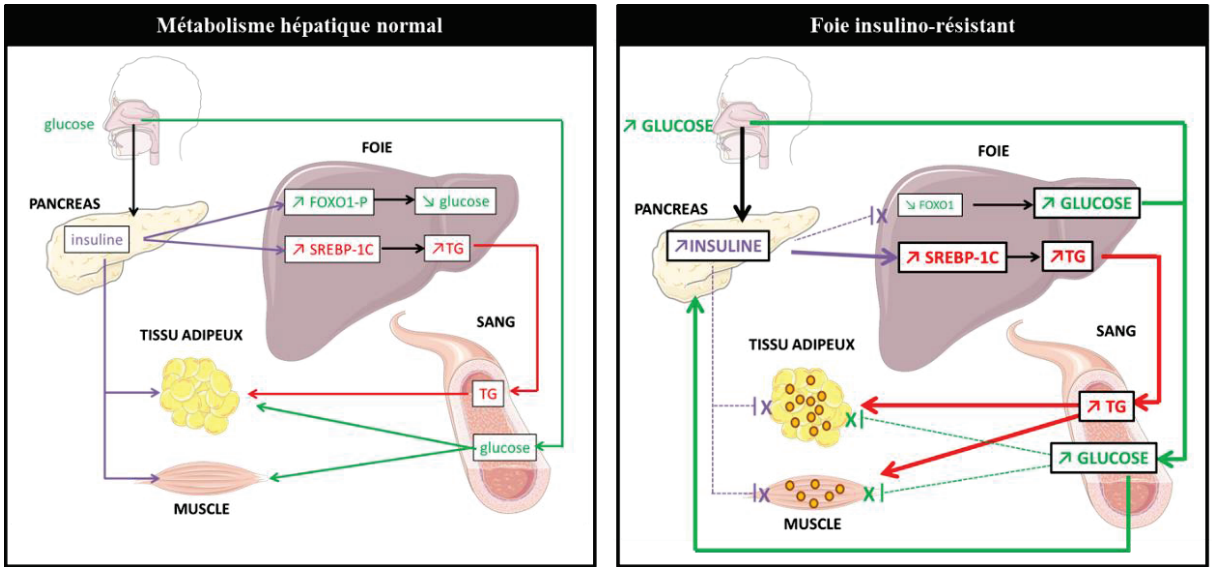


Figure 16 : Mécanismes mis en jeu dans l'insulino-résistance hépatique lors du diabète de type 2 (d'après Brown MS., 2008 (10)).

Chez des rats nourris au régime gras, l'accumulation de lipides, en particulier de diglycérides, active l'expression de la Protéine Kinase C epsilon (PKCε). Ces changements sont associés à la diminution de l'activité tyrosine kinase du récepteur à l'insuline.

L'inhibition de l'expression de PKCε protège les rats de la résistance à l'insuline induite par l'alimentation grasse en préservant l'activité tyrosine kinase du récepteur à l'insuline, sans changement du contenu en diglycérides et triglycérides (48).

Les souris KO pour PKCε sont également protégées de l'insulino-résistance induite par une alimentation hypercalorique fournie pendant 1 semaine, ceci malgré l'augmentation du contenu en lipides (49).

Ce paradigme a été transposé chez l'homme. Dans une cohorte de patients obèses non diabétiques, l'insulino-résistance mesurée par l'HOMA-IR est corrélée avec le taux de diglycérides hépatiques et l'activation de PKCε (17). Magkos *et al.* ont aussi démontré que le contenu en diglycérides hépatiques est un très bon indicateur de l'insulino-résistance hépatique chez les hommes obèses (50). Cependant, analyser le contenu en diglycérides hépatique nécessite d'effectuer au préalable une biopsie, qui reste un acte très invasif.

1.3.3.3 *Intestin et insulino-résistance*

Les hormones dites incrétines sont principalement représentées par *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) et *gastric inhibitory polypeptide* (GIP), deux peptides intestinaux sécrétés par les cellules L entéro-endocrines en réponse aux nutriments ingérés lors d'un repas. Une fois dans la circulation sanguine, les incrétines stimulent rapidement la sécrétion de l'insuline par les cellules β pancréatiques afin de contrôler l'hyperglycémie postprandiale. La particularité des incrétines est qu'à quantité équivalente, une charge orale en glucose induit une réponse à l'insuline beaucoup plus grande que celle obtenue après une perfusion de glucose par voie intraveineuse. C'est ce qu'on appelle l'effet incrétine. On estime que l'effet incrétine est responsable de près de 65% de la sécrétion de l'insuline en réponse au glucose oral chez l'individu sain.

Chez les individus obèses et atteints de DT2, la production d'incrétines est nettement altérée par rapport aux individus en bonne santé. Une étude danoise portant sur 1462 participants a montré que des individus prédiabétiques et DT2 ont une réduction de la sécrétion de GLP-1 en réponse à un test de tolérance orale au glucose (OGTT) par rapport aux individus ayant une tolérance au glucose normale (51). De même, les participants obèses et en surpoids présentaient une réponse incrétine réduite par rapport aux personnes minces. Les résultats de cette étude indiquent que les défauts de sécrétion de GLP-1 surviennent avant l'apparition de l'obésité et du DT2, ce qui pourrait avoir des conséquences sur les stratégies de prévention précoce du diabète.

GLP-1 contrôle également l'homéostasie glucidique par une action au niveau du système nerveux central (52). Dans cette étude, l'équipe de Postic *et al.* a observé que durant une phase d'hyperglycémie à la suite d'un OGTT, l'action de GLP-1 au niveau central déclenche une inhibition de l'utilisation du glucose par le muscle et augmente la sécrétion d'insuline et le stockage hépatique de glycogène. Reconstituer les réserves de glycogène hépatique est un

processus adaptatif garantissant que la quantité de glucose stockée sera suffisante pour être libérée lors de la prochaine période de jeûne.

La coordination de la réponse à l'insuline dépend donc de la communication entre les tissus métaboliques, résumée dans la **Figure 17**.

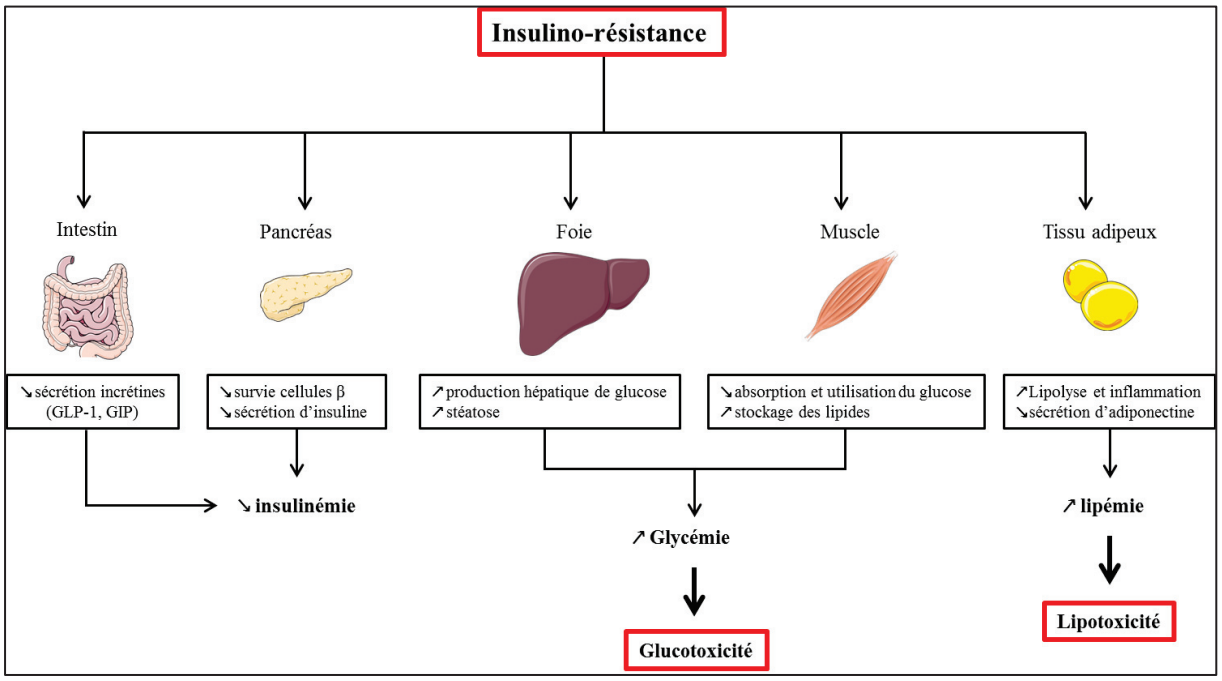


Figure 17 : **Les conséquences métaboliques principales de l'insulino-résistance dans le DT2**. La baisse de la sécrétion et/ou de l'action de l'insuline entraine une augmentation de la lipolyse dans le tissu adipeux, qui a pour conséquence une libération d'acides gras libres dans le plasma. Parallèlement, le foie produit plus de glucose (par glycogénolyse et néoglucogenèse), augmentant de fait la glycémie. La dyslipidémie résultant de la libération des acides gras libres dans le plasma provoque un état de lipotoxicité favorisant l'accumulation de lipides dans le foie (stéatose) et dans le muscle. En plus de la lipolyse, le tissu adipeux insulino-résistant est marqué par une inflammation à bas bruit puisqu'il va sécréter plus de cytokines pro-inflammatoires (TNF-α et IL-6) réduisant les niveaux plasmatiques d'adiponectine. Même si le pancréas tente de s'adapter dans un premier temps à l'hyperglycémie en produisant plus d'insuline (hyperinsulinémie), cette hyperactivité épuise les cellules β qui à la longue ne vont plus être capable de synthétiser de l'insuline en réponse au glucose. La baisse de l'insulinémie est également favorisée par la diminution de la production de GLP-1 par les cellules entéro-endocrines de l'intestin, qui ne stimule plus suffisamment la sécrétion d'insuline par le pancréas en réponse à l'hyperglycémie. Ceci va entretenir la résistance à l'insuline et l'augmentation des taux plasmatiques d'acides gras libres par des mécanismes d'auto-amplification qui vont conduire au DT2.

2 Régulation du métabolisme énergétique

Dans l'étude des maladies métaboliques, l'utilisation des individus mâles est souvent préférée à celle des femelles parce que les phénotypes métaboliques sont plus marqués à cause du cycle ovarien, notamment dans le cas de l'obésité induite pharmacologiquement ou par l'alimentation (53).

Comme évoqué dans le chapitre précédent, les femmes ont non seulement un pourcentage de masse grasse plus important, mais surtout accumulent le gras principalement en sous-cutanée avant la ménopause, une caractéristique associée à une protection par les œstrogènes contre les conséquences négatives de l'obésité et du syndrome métabolique. Après la ménopause, les dépôts adipeux vont se localiser préférentiellement dans la zone viscérale. Parallèlement, l'incidence des troubles métaboliques chez les femmes rejoint celle des hommes. Ainsi, connaître les différences entre les deux sexes représente une opportunité de mieux comprendre les facteurs impactant les maladies métaboliques.

2.1 Dimorphisme sexuel et métabolisme

Les différences sexuelles résultent de la combinaison d'évènements génétiques et hormonaux survenant tout au long de la vie (croissance et développement, puberté, vieillissement, ménopause/andropause). Trois processus majeurs interviennent (**Figure 18**).

2.1.1 Le sexe génétique

Les chromosomes sexuels influent sur le métabolisme énergétique. Ainsi, les gènes portés par les chromosomes X et Y ont des effets directs sur la fonction cellulaire chez les femelles XX et les mâles XY. La présence du chromosome Y accélère le développement et le métabolisme des fœtus mâles XY par rapport aux fœtus femelles XX (54). Ces différences sont dépendantes du gène *Sex-determining region of Y chromosome* (*Sry*) porté par le chromosome Y, qui est le gène du déterminisme sexuel chez les mammifères. En effet, des souris femelles XX portant une copie du gène *Sry* sur un de leur autosome (chromosome non sexuel) présentent à l'âge adulte une augmentation des dépôts de masse grasse associée à une augmentation de la prise alimentaire, en comparaison des souris femelles XY ayant une délétion du gène *Sry* sur le chromosome Y (55). Chez ces mêmes souris, le nombre de chromosomes X va jouer également un rôle dans la détermination de la localisation des dépôts graisseux puisque les souris XX (mâles et femelles) ont une plus grande expansion du tissu

adipeux sous-cutané par rapport aux souris XY (mâles et femelles) qui développent davantage le gras viscéral.

2.1.2 Le pic de testostérone périnatal

Chez la plupart des mammifères, le pic de testostérone périnatal survenant chez les mâles entraine une modification importante de la structure et de la fonction de l'hypothalamus, ce qui contribue à la masculinisation des comportements incluant le comportement alimentaire. Par exemple, les mâles mangent davantage que les femelles. De manière intéressante, une exposition néonatale à la testostérone chez les femelles peut « masculiniser » leur métabolisme et reprogrammer leur prédisposition génétique à l'obésité et au syndrome métabolique, sans modifier les niveaux d'hormones sexuelles à l'âge adulte (53). En effet, on observe une augmentation de la prise alimentaire parallèlement à une diminution du nombre de neurones à pro-opiomélanocortine (POMC) dans le noyau arqué de l'hypothalamus. Ces neurones présentent des propriétés anorexigènes. On observe aussi une augmentation de l'adiposité viscérale caractérisée par une hypertrophie des adipocytes, une augmentation des concentrations en adipokines et une baisse de la sensibilité à l'insuline (56).

2.1.3 Au stade adulte

La plupart des tissus métaboliques expriment des récepteurs spécifiques pour un grand nombre d'hormones incluant les stéroïdes sexuels (androgènes, œstrogènes), mais également l'hormone de croissance, les hormones thyroïdiennes et les glucocorticoïdes. Le dimorphisme sexuel de l'homéostasie énergétique va donc aussi reposer sur des niveaux d'expression de ces hormones différents selon le sexe.

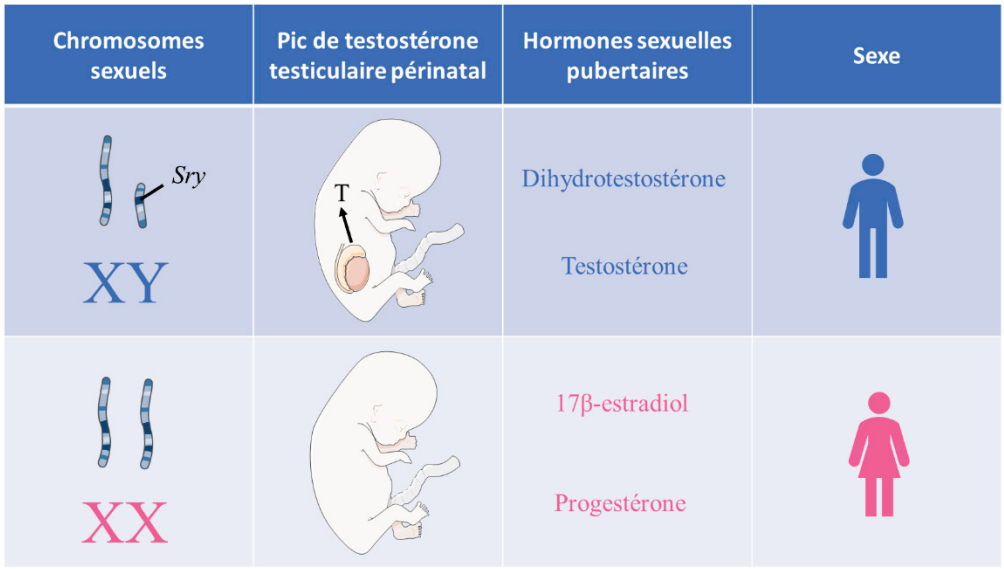


Figure 18 : Les différences sexuelles en physiologie apparaissent pendant le développement et résultent de la combinaison d'évènements génétiques et hormonaux qui continuent après la puberté (d'après Mauvais-Jarvis F., 2017 (57)). Sry : Sex-determining region of Y chromosome, T : Testostérone

2.2 Les stéroïdes sexuels

Les stéroïdes sexuels appartiennent à la grande famille des hormones stéroïdes dont la structure chimique dérive du cholestérol, lipide composé d'un noyau de stérane hydrophobe dont le carbone 3 est porteur d'un groupement hydroxyle (**Figure 19**).

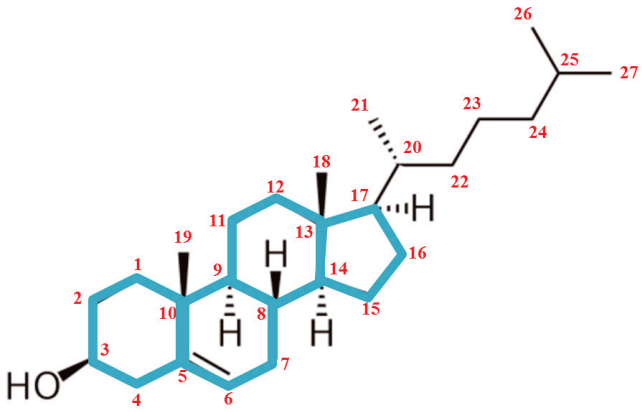


Figure 19: **Structure chimique du cholestérol**. Le noyau stérane est représenté en bleu et l'emplacement des atomes de carbones en rouge.

Les hormones stéroïdes régulent une grande variété de processus physiologiques de la vie fœtale à l'âge adulte (**Figure 20**). Elles sont impliquées dans les fonctions de reproduction, la croissance, l'immunité, l'inflammation et participent à l'homéostasie glucidique, lipidique et

hydro-sodée. Des anomalies de leur sécrétion se caractérisent par des altérations du métabolisme énergétique et possiblement une obésité, comme dans le cas du syndrome de Cushing (glucocorticoïdes), du syndrome de Conn (aldostérone) ou encore du syndrome des ovaires polykystiques (androgènes) où les hormones sont sécrétées en excès.

Classes	Hormones	Formules chimiques	Origines	Propriétés principales à l'âge adulte	Exemples de maladies en lien avec le métabolisme
Glucocorticoïdes	Cortisol		Glandes surrénales	Anti-inflammatoire	Syndrome de Cushing (excès)
Minéralocorticoïdes	Aldostérone		Glandes surrénales	Régulation de la pression artérielle	Syndrome de Conn (excès)
Stéroïdes sexuels	Progestérone		Gonades	Puberté, reproduction, fertilité	Syndrome de Stein-Leventhal, ou syndrome des ovaires polykystiques (excès)
	Estradiol				
	Testostérone				

Figure 20 : Les 3 catégories d'hormones stéroïdes dérivées du cholestérol.

Après l'apparition de la ménopause, les niveaux d'œstrogènes circulants chutent. Or, on sait qu'à des concentrations physiologiques, les œstrogènes exercent chez la femme un rôle protecteur contre le développement des maladies cardiovasculaires, squelettiques et cérébrales. Dans le cas de la ménopause, la déficience hormonale représente un facteur de risque pour les maladies métaboliques, prédisposant à l'obésité, au syndrome métabolique, au DT2 et à certains cancers (58,59). L'implication de l'absence d'œstrogènes ovariens dans le développement des maladies chroniques chez la femme constitue un véritable challenge thérapeutique de ce siècle. Pour répondre à ce problème et trouver de nouvelles applications thérapeutiques, il est nécessaire de comprendre la contribution des œstrogènes dans la balance énergétique et dans l'homéostasie glucidique et lipidique.

2.2.1 Les œstrogènes

Chez l'adulte il existe trois formes non conjuguées et biologiquement actives des œstrogènes : l'*estrone* (E1), le *17β-œstradiol* (E2) et l'*estriol* (E3). Une autre forme existe, mais est uniquement produite lors de la grossesse par le foie du fœtus : l'*estétrol* (E4) (60). Chez la femme cyclée, l'E2 constitue l'œstrogène majoritaire.

2.2.1.1 *La synthèse des œstrogènes*

A partir de la puberté jusqu'à la ménopause, les œstrogènes sont produits majoritairement par les ovaires après aromatisation des précurseurs androgéniques comme l'*androstenedione* et la testostérone respectivement en E1 et en E2. Cette conversion enzymatique est réalisée par l'aromatase codée par le gène *Cyp19a1* (**Figure 21**).

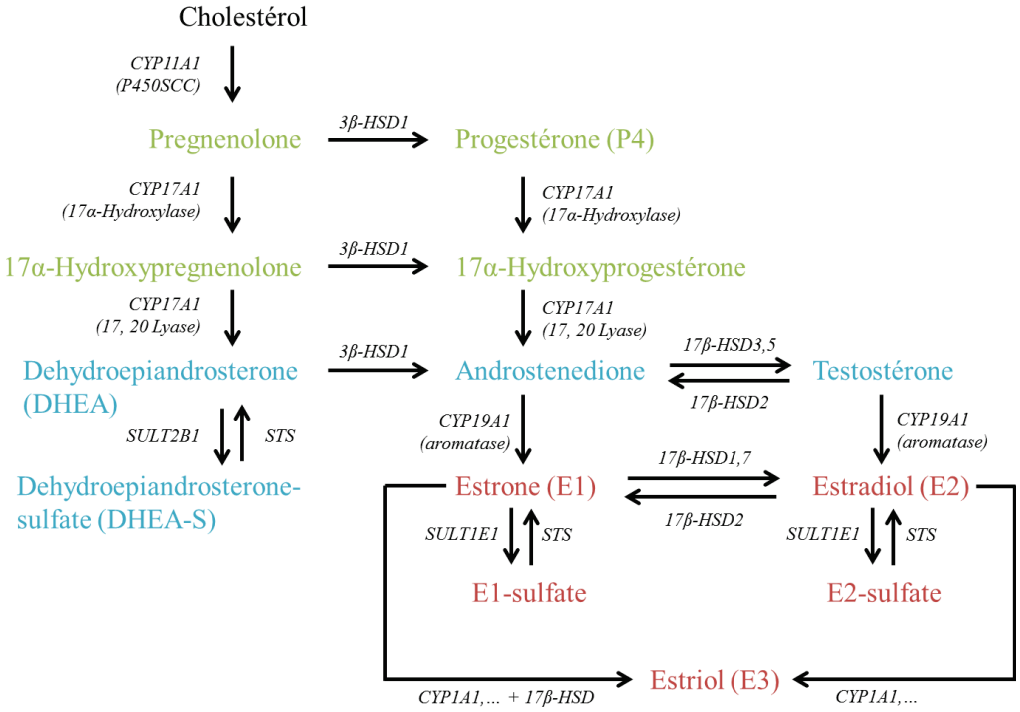


Figure 21 : **Voies de biosynthèse des œstrogènes à partir du cholestérol**. On retrouve les stéroïdes de la famille des progestatifs (en vert), des androgènes (en bleu) et des œstrogènes (en rouge). Les enzymes de conversion sont notées en italique. CYP : Cytochrome P450, HSD : hydroxysteroid dehydrogenase, P450SCC : P450 side-chain cleaving enzyme, STS : steroid sulfatase, SULT : sulfotransferase.

Chez l'homme obèse et la femme ménopausée dont les niveaux plasmatiques d'œstrogènes sont faibles, le tissu adipeux, la peau, l'os, les surrénales, les muscles et l'endothélium vasculaire représentent une source de production d'E2 sous l'action de l'aromatase présente dans ces tissus périphériques (61,62). Cette hormone va alors exercer une action locale et non plus à distance. Les précurseurs d'E2 sont l'*androstenedione*, le *dehydroepiandrosterone* (DHEA), ainsi que le *dehydroepiandrosterone-sulfate* (DHEA-S) produit exclusivement par les glandes surrénales (63).

Situations physiologiques	Concentrations plasmatiques en E2 (pg/mL)
Avant la puberté	< 35
Phase folliculaire	50
Ovulation	130 - 200
Phase lutéale	100 - 150
Grossesse	200 - 30000
Ménopause	15 - 55

Figure 22 : Niveaux plasmatiques d'œstradiol au cours de la vie d'une femme (valeurs adaptées de Chabbert Buffet N., 1998 (64))

2.2.1.2 *Le transport et le métabolisme des œstrogènes*

Dans le plasma, E2 est transporté par l'albumine et la *sex hormone-binding globulin* (SHBG). Une très faible portion de l'E2 (≈ 2%) reste libre et correspond à la forme active de cette hormone.

Le métabolisme des œstrogènes s'effectue principalement par des réactions de conjugaison dont les 2 principales sont la sulfatation et la glucurono-conjugaison (**Figure 23**). Ces 2 réactions consistent en l'ajout d'un groupement sulfate ou glucuronide au niveau du groupement hydroxyle (OH) présent sur le carbone 3 de l'œstrogène. Les enzymes responsables des réactions de sulfatation et de glucurono-conjugaison sont respectivement l'*estrogen sulfotransferase* (EST) de la famille des sulfotransférases (SULT), et l'*UDP-glucuronosyltransferase* (UGT). Les œstrogènes conjugués sont plus hydrophiles et vont être éliminés par excrétion urinaire ou dans la bile. Le plasma humain contient de grandes quantités d'œstrogènes conjugués comme le DHEA-S, l'estrone-sulfate (E1-S) et l'œstradiol-sulfate (E2-S). Avec une demi-vie relativement longue dans le plasma, E1-S et E2-S sont retrouvées à des concentrations 10 fois supérieures à celles de leurs homologues non conjugués E1 et E2 (65,66).

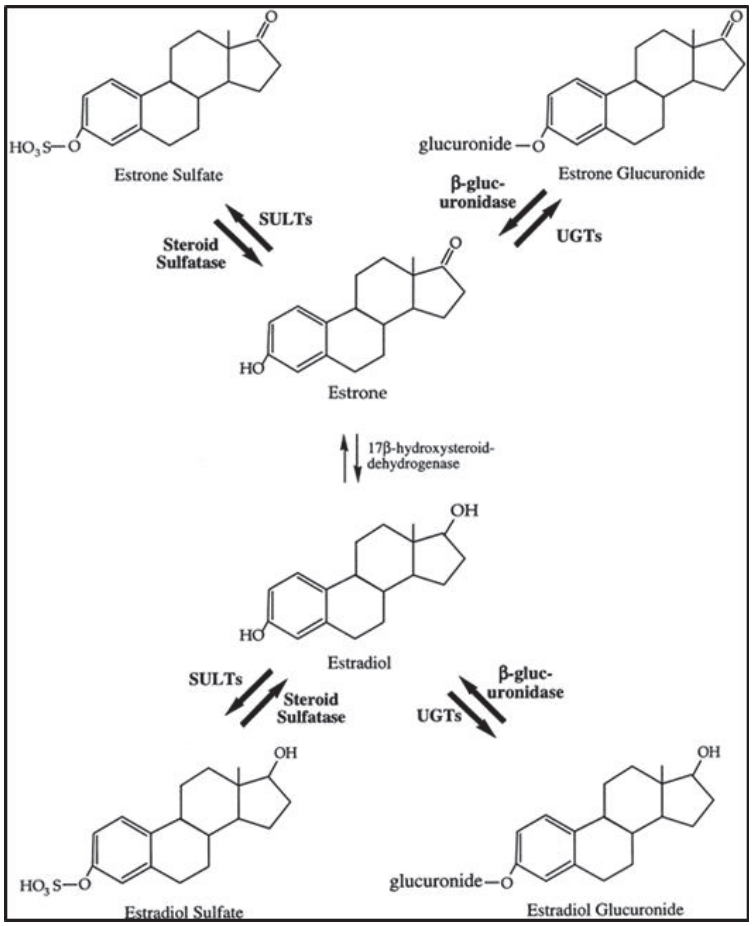


Figure 23 : **Voies de métabolisation de l'estrone et du 17β-œstradiol**. Les réactions de sulfatation, désulfatation, glucuronidation et déglucuronidation sont catalysées respectivement par les *sulfotransférases* (SULTs), la *steroid sulfatase*, l'*UDP-glucuronosyltransferase* (UGT), et la *β-glucuronidase* (adapté de Raftogianis R., 2000 (67)).

En général, la glucuronidation et la sulfatation sont associées au catabolisme et à l'élimination des hormones stéroïdiennes. Cela permet également un recyclage des hormones. Par exemple, E1-S et E2-S véhiculées jusqu'à leurs cellules cibles par le système circulatoire y sont hydrolysées par la stéroïde sulfatase (STS) et peuvent alors se fixer à leurs récepteurs et initier la cascade de signalisation. EST et STS sont des enzymes importantes respectivement dans la régulation négative et positive de l'activité œstrogénique (68).

En favorisant l'élimination des œstrogènes par sulfatation, EST est protecteur contre certains effets délétères induits par les œstrogènes. Ainsi, des souris mâles déficientes pour cette enzyme ($EST^{-/-}$) présentent des lésions dans leur système reproducteur. Le défaut de sulfatation des œstrogènes provoque un excès d'œstrogènes qui, par stimulation chronique, conduit au développement d'une stérilité chez les mâles (69). L'excès d'œstrogènes retrouvé également chez les souris femelles $EST^{-/-}$ entraine une thrombose placentaire et une perte spontanée du fœtus (70).

L'expression d'EST est fortement induite dans le foie de souris obèses et diabétiques (71,72). Les travaux de Leiter *et al.* suggèrent que l'inactivation des œstrogènes dans le foie peut contribuer à l'insulino-résistance. La suppression de l'expression d'EST dans un modèle de souris femelles rendues diabétiques génétiquement (ob/ob) ou par l'alimentation améliore l'homéostasie du glucose (72). La déficience en EST rétablit l'action des œstrogènes hépatiques, améliore la sensibilité à l'insuline et la capacité de l'insuline à supprimer la production hépatique de glucose. De plus, ces souris femelles perdent du poids par diminution de la masse grasse, ont une augmentation de la dépense énergétique et une diminution de la stéatose hépatique.

De manière intéressante, les effets antidiabétiques liés à l'absence d'EST n'ont pas été observés chez les souris mâles. En effet, l'absence d'EST chez les mâles ob/ob a provoqué une inflammation du tissu adipeux, qui a aggravé le phénotype diabétique en provoquant une inflammation des îlots pancréatiques et un défaut de sécrétion de l'insuline par les cellules β en réponse au glucose (72).

L'expression d'EST dans le tissu adipeux jouerait également un rôle dans le maintien de l'homéostasie énergétique puisque le rétablissement de son expression dans le tissu adipeux des souris mâles obèses et déficientes pour EST réduit l'inflammation locale et systémique, améliore la sensibilité à l'insuline et augmente la dépense énergétique (68).

2.2.2 Les récepteurs aux œstrogènes

Les œstrogènes agissent *via* des mécanismes génomiques impliquant les récepteurs nucléaires ERα et ERβ, et des mécanismes non génomiques impliquant des récepteurs membranaires tels que GPER.

2.2.2.1 *Généralités*

En 1962, Jensen et Jacobsen ont identifié pour la première fois une protéine de liaison aux œstrogènes dans l'utérus de rate. Il s'agissait du récepteur alpha aux œstrogènes nommé ERα. Plus tard, un 2ème récepteur est identifié : ERβ. Les protéines ERα et ERβ sont codées respectivement par les gènes *Esr1* et *Esr2*. Elles appartiennent à la catégorie des récepteurs aux stéroïdes de la superfamille des récepteurs nucléaires. Ces derniers sont composés de 6 régions fonctionnelles notées de A à F (**Figure 24**). L'œstradiol interagit avec son récepteur par le domaine de liaison au ligand (LBD) présent dans la région E. La différence de structure du LBD entre les 2 récepteurs a permis le développement de ligands spécifiques : le propyl

pyrazol triol (PPT) et le 2,3-bis (4-hydroxyphenyl)-propionitrile (DPN) qui sont fréquemment utilisés comme agonistes sélectifs d'ERα (PPT) et ERβ (DPN). Les différences de structures suggèrent que ces 2 récepteurs peuvent servir des actions différentes.

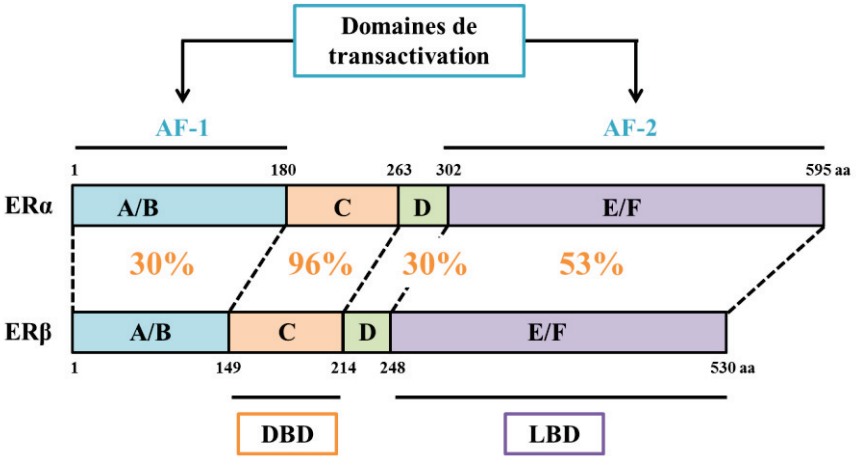


Figure 24 : **Comparaison structurelle des récepteurs ERα et ERβ humains**. Les pourcentages d'homologie de séquence des différents domaines sont indiqués au milieu des 2 séquences. (D'après Muramatsu M., 2000 (73))

ERα prédomine dans le système reproducteur féminin (utérus, ovaires) qui regroupe les principaux tissus cibles de l'action des œstrogènes, mais aussi le sein, le rein, l'os, le foie et le tissu adipeux. ERβ prédomine dans les tissus qui ne sont pas fortement dépendants des œstrogènes, tels que les organes reproducteurs mâles et les tissus non reproducteurs (SNC, poumons, colon, rein). Cependant, dans l'ovaire, principal site de production d'œstrogènes, le niveau d'ERβ est égal à celui d'ERα (74).

Par des procédés d'épissage alternatif des ARN messagers (ARNm), il existe plusieurs isoformes pour ERα et ERβ (**Figure 25**). En plus de la forme complète d'ERα (ERα 66 kDa) responsable de la plupart des actions génomiques, 3 autres isoformes sont connues :

- ERα Δ3 : Perte de l'exon 3, qui code pour une partie du DBD (75).

- ERα 46 kDa : Protéine ne possédant plus le domaine AF-1 en N-terminal. Dans la lignée cellulaire de cancer du sein MCF-7, ERα 46 kDa antagonise les effets prolifératifs induits par la forme à 66 kDa (76).

- ERα 36 kDa : Protéine ne possédant plus les domaines AF-1 et AF-2. Exprimé principalement dans le cytoplasme et la membrane plasmique, il induit des effets œstrogéniques rapides et inhibent les effets génomiques.

Chez l'homme, 4 isoformes d'ERβ existent en plus de la forme classique ERβ1 (ERβ2, ERβ3, ERβ4, ERβ5). Elles présentent toutes une forme tronquée du LBD dans la partie C-terminale de leur séquence, empêchant la fixation des œstrogènes. Actuellement aucune fonction physiologique n'a été décrite pour ces variants d'épissage, qui semble être exprimés seulement dans certains cancers mais pas dans les tissus sains (77).

Des expériences *in vitro* ont montré que les isoformes humaines ERβ1-3 sont capables de se fixer à l'ADN au niveau d'une même séquence synthétique d'ERE en formant soit des homodimères, soit des hétérodimères avec ERα mais aussi entre chaque isoformes ERβ1-3 (78). ERβ4-5 sont également capables de se fixer à l'ADN. De plus, ces deux variants d'épissage peuvent multiplier par 3 l'activité transcriptionnelle indépendante des œstrogènes par rapport à ERβ1 (79).

ERα et ERβ ont des actions qui peuvent être synergiques ou opposées. Par exemple, une étude sur des cellules T47D issues de cancer du sein a montré qu'ERβ1 inhibait jusqu'à 70 % des gènes régulés par ERα (80). Les travaux de Poola *et al.*, ont montré qu'ERβ4-5 forment des hétérodimères avec ERα et inhibent son activité transcriptionnelle en présence d'1 nM d'œstrogènes. ERα est également capable d'inhiber partiellement l'activité transcriptionnelle indépendante des œstrogènes d'ERβ5, mais pas d'ERβ4, montrant pour la première fois qu'ERα module ERβ (79).

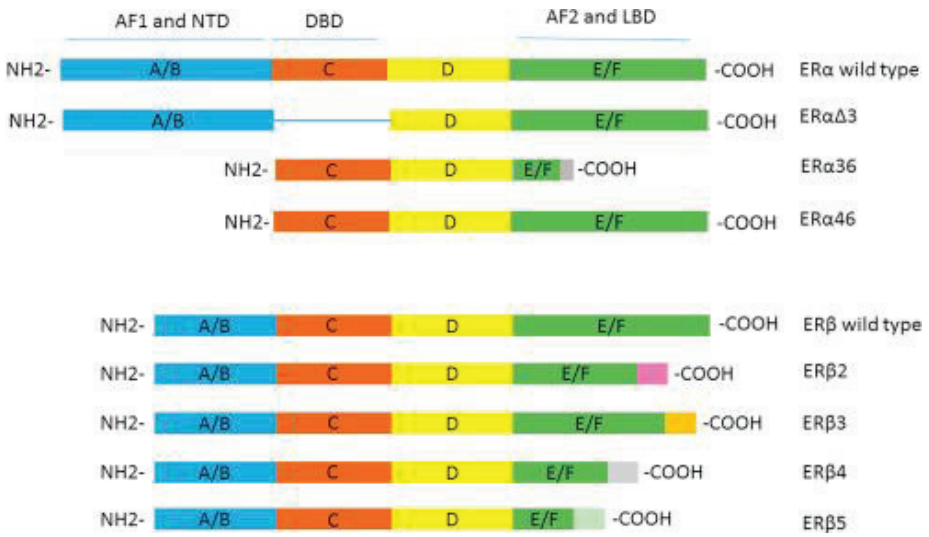


Figure 25 : Structure schématique des différentes isoformes d'ERα et ERβ (adapté de Jia M., 2015 (81))

En plus des récepteurs nucléaires, E2 peut se fixer sur des récepteurs membranaires comme GPER. Anciennement nommé GPR30, cette protéine de la famille des récepteurs couplés aux

protéines G (RCPG) était considérée comme un récepteur orphelin à sa découverte. Ce récepteur est exprimé dans différents types cellulaires, dont l'appareil reproducteur mais également les tissus métaboliques incluant le pancréas, le tissu adipeux, le foie, le muscle squelettique, le SNC, le cœur, l'intestin et les cellules inflammatoires (82).

2.2.2.2 *Les mécanismes d'actions*

Les effets œstrogéniques au niveau des cellules cibles passent par des mécanismes d'actions dits génomiques (ou nucléaires) et non génomiques (ou extranucléaires). Tandis que les premiers peuvent durer plusieurs heures, les derniers peuvent apparaître très rapidement, parfois dans les secondes suivant l'exposition aux œstrogènes (**Figure 26**).

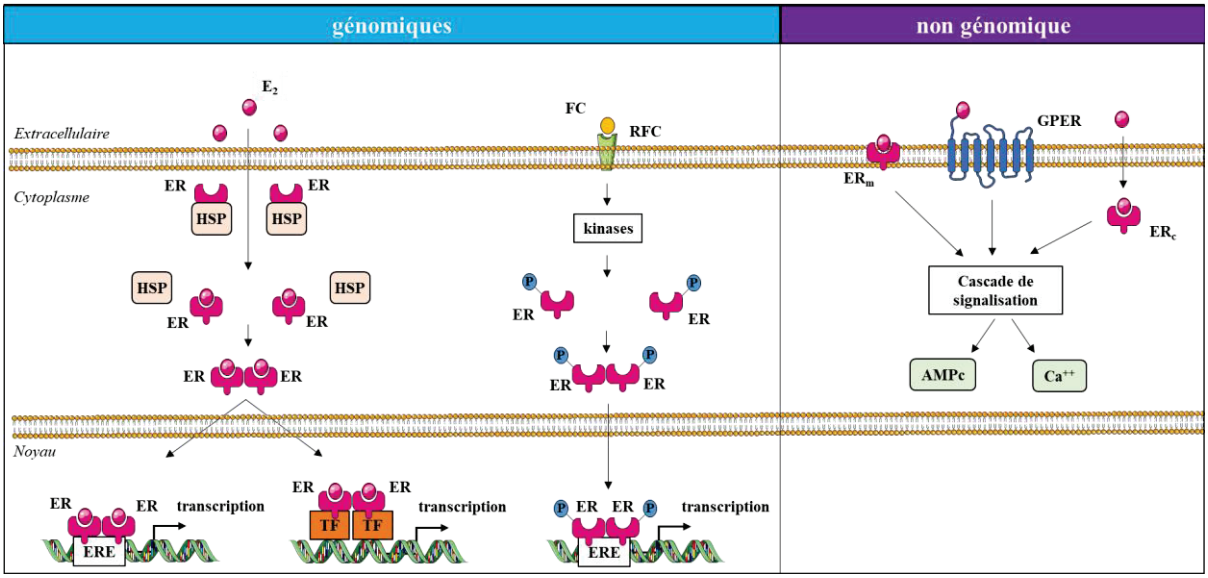


Figure 26 : Mécanismes d'actions génomiques (à gauche) **et non génomiques** (à droite) **des récepteurs aux œstrogènes**. E_2 : œstradiol, ER : Estrogen receptor, ER_m : membrane-associated estrogen receptor, ER_c : cytoplasm-associated estrogen receptor, ERE : Estrogen response element, FC : Facteur de croissance, HSP : Heat shock protein RFC : Récepteur aux facteurs de croissance, TF : Transcription factor.

- <u>Les mécanismes d'actions génomiques</u> : A l'état basal, les récepteurs aux œstrogènes sont cytoplasmiques et fixés à des protéines chaperonnes. La fixation des œstrogènes aux récepteurs provoque le détachement des chaperonnes aux ER, puis un changement de conformation des ER permettant la formation d'homodimères (ERα/ ERα, ERβ/ ERβ) ou d'hétérodimères (ERα/ERβ). S'ensuit une translocation des complexes ER/E dans le noyau, permettant leur interaction avec les régions promotrices des gènes cibles soit par association directe à une région spécifique de l'ADN (appelée *estrogen response element* ou ERE), soit indirectement en établissant des complexes avec d'autres facteurs de transcription comme AP-

1 et SP-1. Les ERE sont des séquences consensus constituées de 2 demi-sites palindromiques séparés par 3 nucléotides (AGGTCAnnnTGACCT).

Les ER peuvent être activés au niveau d'ERE indépendamment des œstrogènes. Ce mécanisme implique des facteurs de croissance qui vont activer les protéines kinases dont la cascade de signalisation aboutit à la phosphorylation des ER et la transcription de gènes cibles.

- Les mécanismes d'action non génomiques : Les actions membranaires (non génomiques) sont connues sous le nom de *membrane-initiated steroid signaling* (MISS). Ils correspondent à l'activation rapide par les hormones stéroïdiennes de plusieurs voies de signalisations cytoplasmiques à travers la modulation du niveau de seconds messagers comme l'AMPc et le calcium, et du niveau de phosphorylation de protéines *via* les voies MAPK et PI3K/AKT. Parmi les récepteurs impliqués dans la voie extranucléaire, on retrouve des formes cytosoliques et membranaires d'ER, ainsi que GPER (83). Il existe aussi des *cross-talks* ou interactions entre ces signalisations impliquant l'activation de la protéine *epidermal growth factor receptor* (EGFR) qui viennent complexifier les mécanismes.

2.3 Les effets métaboliques des œstrogènes

La connaissance de la contribution des œstrogènes à l'homéostasie énergétique repose non seulement sur les modèles d'ovariectomie (**Figure 27**) mais également sur la génération de souris n'exprimant pas les récepteurs ERα, ERβ, GPER et l'aromatase à la fois chez les mâles et les femelles (**Figure 28**). Ainsi on observe que la plupart des modèles de KO total aboutit dans les deux sexes à des altérations métaboliques importantes impactant la dépense énergétique et la prise alimentaire, la lipogenèse *de novo* dans le tissu adipeux ainsi que le foie, et que le pancréas est un organe très largement régulé par les œstrogènes.

2.3.1 Les modèles d'ovariectomie

L'ovariectomie augmente la prédisposition à l'obésité chez les femelles. En effet, la comparaison de souris mâles et femelles nourries au régime gras montre qu'à âge et prise alimentaire équivalente, les souris mâles sont plus susceptibles de devenir obèses que les souris femelles cyclées. Chez les femelles, la déficience hormonale favorise la prise de poids par accumulation de masse grasse (84), d'autant plus si les souris suivent un régime riche en graisses (85).

Cet effet sur le poids est concomitant à une baisse de la dépense énergétique. Dans une étude Yonezawa *et al.* ont pu constater qu'une baisse de la consommation d'oxygène et de l'activité locomotrice est responsable de la réduction de la dépense énergétique chez les souris ovariectomisées (85). Witte *et al.* ont également observé en condition d'ovariectomie une baisse de l'activité locomotrice aussi bien chez des rates que des souris (84).

Au cours d'un clamp euglycémique hyperinsulinémique, le débit de glucose nécessaire pour maintenir l'euglycémie a été réduit de manière significative chez les souris ovariectomisées par rapport aux souris sham (chirurgie sans ablation des ovaires) et aux souris recevant de l'E2, ce qui démontre une moindre sensibilité à l'insuline chez les souris ovariectomisées (86). Pae *et al.* ont montré que la perte de la fonction ovarienne couplée à un régime gras favorise l'insulino-résistance (87).

L'insulino-résistance développée dans le modèle d'ovariectomie a des conséquences sur les tissus métaboliques. Au niveau du tissu adipeux, en plus de l'hypertrophie des adipocytes, il a été montré une diminution du métabolisme oxydatif (86), une augmentation du stress oxydant (88), une augmentation de l'expression des marqueurs de l'inflammation tels que Il-6 et TNFa (89) avec une infiltration de macrophages de type M1 (pro-inflammatoires) via l'expression de marqueurs tels que MCP-1 et CD11c (90). Dans le foie, on retrouve une augmentation de la lipogenèse entrainant une stéatose (91) qui peut progresser en fibrose par augmentation des lésions hépatiques (92).

De manière intéressante Benedusi *et al.* (93) ont remarqué d'une part qu'à âge équivalent, les souris ovariectomisées ont une plus grande probabilité de mort que les souris témoins non ovariectomisées (sham). D'autre part, l'ovariectomie accélère la progression de l'inflammation basale dans le foie, le tissu adipeux et l'aorte par augmentation précoce de l'expression des marqueurs inflammatoires TNFα, IL-1β, IL-6 et MCP-1. Ce niveau élevé d'inflammation est maintenu avec le vieillissement, alors que chez les femelles cyclées l'expression des marqueurs inflammatoires est directement proportionnelle à l'âge. Ces résultats suggèrent que la baisse de la longévité des souris ovariectomisées pourrait être due à une accélération du niveau basal d'inflammation dans les tissus métaboliques, probablement par manque d'activité anti-inflammatoire médiée par les œstrogènes (93). Ces évènements ne sont pas observés chez les mâles gonadectomisés, indiquant que la testostérone, contrairement aux œstrogènes, n'impacte pas l'inflammation.

La plupart des altérations métaboliques sont corrigées par traitement par E2 exogène. Ceci signifie qu'E2, en agissant sur ses récepteurs, contribue au maintien du poids, de l'activité musculaire, de la tolérance au glucose, de la sensibilité à l'insuline et régule l'inflammation et la fonction hépatique.

Modèles	Régimes	Ovariectomie (OVX)	Traitement E2	Euthanasie	Durée OVX	Phénotype métabolique	Réversibilité par E2	Références
souris C57BL/6	Restriction calorique (-30%) + LFD + HFD	6 sem	-	26 sem	20 sem	↗ poids (↗ MG)	-	(243)
souris C57BL/6J	CD + HFD	4 sem	5 sem : E2 (80µg/kg/j) en implant sc.	8 sem et 16 sem	4 sem et 12 sem	↗ poids	oui	(216)
						intolérance au glucose (↗ glycémie, ↘ GIR)	oui	
						muscle : ↘ signalisation insuline (pAKT, IRS1, pAMPK)	oui	
						foie + TA : inflammation (IL6, TNFa, IL-1b, PAI-1, infiltration macrophages)	non (aggravation)	
souris C57BL/6J	CD	15 sem	-	18 sem	3 sem	↗ poids (↗ MG) + ↘ activité locomotrice	-	(84)
souris C57BL/6J	de 11-17 sem : CD et HFHC	10 sem	E2 (0,5mg/60j) en implant sc.	17 sem	7 sem	foie : ↗ lésions hépatiques + ↗ fibrose + ↗ inflammation (↗ infiltration macrophages + ↗ gènes de l'inflammation)	oui	(92)
						sérum : ↗ cholestérol	oui	

Modèles	Régimes	Ovariectomie (OVX)	Traitement E2	Euthanasie	Durée OVX	Phénotype métabolique	Réversibilité par E2	Références
souris C57BL6/J	entre 8-9 sem : CD; entre 10-16 sem (+10 j) : CD et HFD	16 sem	E2 (50µg/kg/j) en implant sc. + E2 (1µg/kg/j) en icv	16 sem (+10 j)	10 j	↗ poids (↗ TAv + ↗ TAsc) + intolérance au glucose + insulinorésistance	oui (E2sc et E2icv)	(85)
						TA : hypertrophie adipocytes + ↗ macrophages + ↗ leptine, ↘ TG, ↗ LPL, ↗ inflammation	oui (E2sc : ↘ inflammation + ↘ lipogenèse; E2icv : ↗ lipolyse)	
						foie : ↗ néoglucogenèse	oui (E2sc et E2icv)	
							E2icv : ↗ Tc + dépense énergétique (TAbrun)	
souris C57BL/6J	13 sem : CD + HFD	12 sem	-	30 sem	18 sem	↗ poids (↗ MG)	-	(89)
						sérum : ↗ chol + ↗ TG + ↘ adiponectine + ↗ leptine + ↗ IL-6		
						foie : ↗ stéatose		
						TA : ↗ inflammation (TNFa + IL6) + ↗ taille adipocytes		
souris C57BL/6J	8 sem : LFD + HFD	6 sem	9 sem : E2 (5µg/kg) en implant sc.	18 sem	12 sem	↗ poids (↗ MG)	oui	(88)
						sérum : ↗ TG	oui	
						TA : ↗ taille adipocytes + ↗ stress oxydatif (γH2AX) + ↗ inflammation (CD68 + TNFa) + ↘ lipolyse (PKA + HSL + ATGL)	oui	
						Foie : ↗ stéatose + ↗ inflammation (ALT)	oui	
						↗ Insulinorésistance	oui	
souris	avant 8 sem : CD; de 8-12 sem : HFD	8 sem	E2 (70µg/kg) en implant sc.	12 sem	4 sem	↗ poids (↗ MG), intolérance au glucose + insulino-résistance + ↘conso O2 et production CO2, ↘ activité la nuit, ↘ prise alimentaire (=↗efficacité énergétique)	oui	(86)
						TA : ↘ métabolisme oxydatif	oui	
						foie : ↗ lipogenèse	oui	
						muscle : ↗DAG + ↗ TG + ↘ PKCθ	oui	

Modèles	Régimes	Ovariectomie (OVX)	Traitement E2	Euthanasie	Durée OVX	Phénotype métabolique	Réversibilité par E2	Références
souris C57BL/6J	CD ?	6 sem	-	18 sem	12 sem	↗ poids (↗ MG + taille adipocytes)	-	(90)
						sérum : ↗ inflammation (MCP-1) + ↗ M-CSF + ↗ ROS (H2O2) + intolérance au glucose (↗ glucose)		
						TA : ↗ inflammation + infiltration macrophages (MCP-1, CD11b-c, CD4+, CD8+)		
souris C57BL/6 PPRE-lucRepTOP™ + ERE-LucRepTOP™	CD (estrogènes-free)	protocole âge : 20 sem; protocole LTovx/STovx : 4 vs 16 sem	-	protocole âge : 24–48–72–88 sem. protocole LTovx/STovx : 20 sem	protocole âge : 4–28–52–68 sem. protocole LTovx/STovx : 4-16 sem	protocole âge : ↗ poids à 48 sem (puis stable) + ↗ inflammation à 48 sem (foie/TAv/aorte) + ↘ recrutement et activation macrophages avec le temps (TAv) + ↘ progressive des LTreg (TAv)	-	(93)
						LTovx : ↗ inflammation + ↗ taille adipocytes + ↗ recrutement et activation des macrophages	-	
souris ICR	7 sem : CD avec ou sans arsenic dans l'eau de boisson	4 sem	E2 (10µg/kg/j) en injections sc.	13 sem	9 sem	↗ poids (↗ MG) + ↗ glucose + ↗ insuline + ↗ intolérance au glucose + ↗ insulinorésistance + ↘ adiponectine	oui	(244)
						foie : ↗ PEPCK + ↘ glycogène	oui	
						pancréas : ↘ GSIS	oui	
souris C57BL/6J	LFD + HFD	8-10 sem	Estradiol benzoate (300 µg/kg) par voie orale	20 sem	10-12 sem	↗ poids (↗ MG + ↘ MM) + ↗ efficacité énergétique	oui	(232)
						sérum : ↗ glucose + ↗ leptine + ↗ ghréline + ↗ MCP-1	oui (ghréline + MCP-1 seulement en LFD)	
						↗ intolérance au glucose	oui	
						ARC : ↘ Agrp + ↘ Ghsr + ↘ Lepr + ↗ Insr	oui (Lepr et Insr seulement en LFD)	
						Foie : ↘ Insr + ↘ Foxo1 + ↘ UCP-2 + ↗ métabolisme des acides gras (Acc1, Acc2, Acly, Fatp5, Fas)	oui (Insr, Foxo1 et Fatp5 seulement en LFD, Fas seulement en HFD)	
souris C57BL/6J	de 5-9 sem : CD; de 9-16 sem : LFD et HFD	7 sem	-	25 sem	18 sem	↗ poids (↗ MG) + ↗ intolérance au glucose	-	(87)
						TA : hypertrophie adipocytes + ↗ inflammation (↗ macrophages M1 + LT + LB + NK + NKT)		

Figure 27 : Effets métaboliques de l'ovariectomie sur des modèles murins, avec ou sans administration d'œstradiol.

2.3.2 Les modèles KO :

Nom	Phénotype des souris invalidées pour le gène	mâles	femelles	références
ERα	Hyperplasie et hypertrophie du tissu adipeux, insulino-résistance et intolérance au glucose.	X	X	(245)
	Insulino-résistance hépatique, intolérance au glucose, ↑ leptine / ↓ Lepr, lipogenèse (↑Scd1)	X	X	(103)
ERβ	↑ poids corporel et de la masse grasse, ↓ stéatose hépatique, ↑ tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline	-	X	(107)
GPER	Hyperglycémie et intolérance au glucose, légère ↓ du poids corporel sans ↓ de la masse grasse, ↓ libération de l'insuline par le pancréas	-	X	(111)
	↑ poids corporel et de l'adiposité	X	X	(246)
	↑ poids corporel sans ↑ de la masse grasse, ↓ dépense énergétique + ↓ thermogenèse + ↓ adiponectine + résistance à l'effet anorexigène de la leptine et de CCK.	X	X	(98)
	↓ poids corporel par ↓ masse grasse et de la taille des adipocytes + ↓ différenciation des adipocytes + ↑ tolérance au glucose et sensibilité à l'insuline	-	X	(230)
Aromatase	Insulino-résistance, intolérance au glucose, ↑ adiposité viscérale associée à une ↓ activité physique, de l'oxydation du glucose et de la masse maigre. ↑ leptine, du cholestérol et de l'insuline	X	X	(247)

Figure 28 : Phénotypes métaboliques associés à des modèles génétiques de déficience en œstrogènes chez la souris (adapté de Le Magueresse-Battistoni B., 2018 (94)).

2.3.2.1 *Prise alimentaire et dépense énergétique*

Les œstrogènes exercent une activité de type anorexigène au niveau du système nerveux central (SNC). Chez des rates intactes, l'œstradiol amplifie l'action anorexigène de la leptine administrée au niveau de l'hypothalamus (95). De plus, l'infusion d'œstrogènes dans certaines zones hypothalamiques comme le noyau arqué (NA) et le noyau paraventriculaire (NPV) réduit la prise alimentaire et le poids corporel.

L'effet anorexigène de l'E2 est présent chez des souris femelles sauvages mais est perdu suite à l'inactivation d'ERα, démontrant également que l'activation d'ERα est anorexigène. La seule inhibition de l'expression d'ERα dans le noyau ventromédial de l'hypothalamus (VMH) suffit chez les souris femelles et les rates au développement d'une obésité, d'une réduction de la dépense énergétique et d'une hyperphagie (96).

Les souris invalidées pour GPER développent une obésité (**Figure 28**) dans, au moins, une des 4 lignées transgéniques existantes (97,98). De façon intéressante, Davis et ses collaborateurs ont montré que l'augmentation du poids corporel des souris femelles n'était pas

associée à une augmentation de la masse grasse, mais à une diminution de la dépense énergétique (98).

2.3.2.2 *Lipogenèse dans le foie et le tissu adipeux*

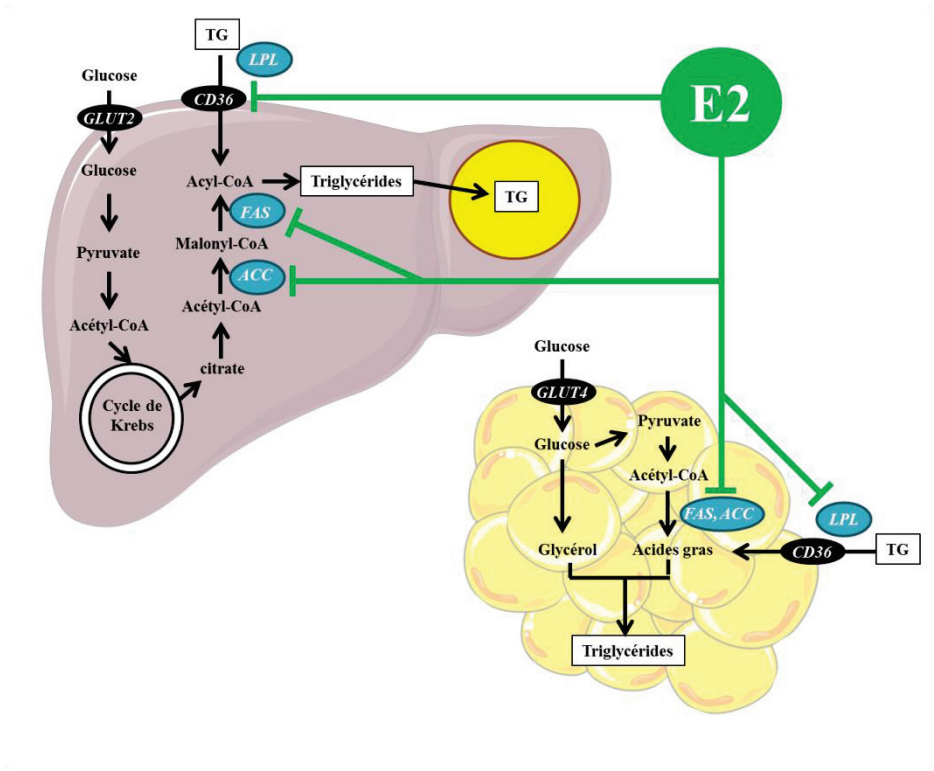


Figure 29 : Effets de l'œstradiol sur des acteurs de la lipogenèse dans le foie et le tissu adipeux.

Les œstrogènes s'opposent à l'accumulation de tissu adipeux blanc en réduisant la synthèse d'acides gras et de TG. La synthèse de TG est principalement médiée par LPL, l'enzyme limitante dans l'importation des acides gras libres dans l'adipocyte à des fins de stockage (**Figure 29**). Le gène Lpl présente un ERE dans son promoteur, et l'interaction des œstrogènes avec l'ERE *via* ses récepteurs régule négativement l'expression de l'ARNm Lpl (99). Des souris femelles déficientes pour le gène de l'aromatase (Arom-KO) présentent une augmentation de l'expression de Lpl dans le tissu adipeux gonadique. Ceci signifie que l'E2 inhibe Lpl puisque l'expression de Lpl se normalise après supplémentation par de l'E2 (100).

De plus, D'Eon et ses collaborateurs ont montré que l'administration d'E2 *in vivo* chez la souris ovariectomisée diminue la taille des adipocytes par réduction de l'absorption des acides gras (régulation négative de LPL) et de la lipogenèse *de novo* (régulation négative de *acetyl-coA carboxylate* ACC et *fatty acid synthase* FAS). Il y a également augmentation de la lipolyse induite par les catécholamines (101).

La déficience en œstrogènes est également associée à une accumulation de lipides dans le foie. Ainsi des souris déficientes pour GPER et nourries avec un régime riche en graisses développent une stéatose hépatique (102).

2.3.2.3 *Sensibilité à l'insuline*

Bryzgalova et ses collaborateurs ont observé chez des souris ERα-KO une diminution de la suppression de la production hépatique de glucose par l'insuline lors d'un clamp euglycémique hyperinsulinémique, sans changement de la sensibilité à l'insuline dans le muscle squelettique (103). Dans ce modèle, l'absence d'ERα a entrainé une insulino-résistance hépatique. En revanche Ribas *et al.* ont montré que les souris ERα-KO accumulaient des lipides pro-inflammatoires dans le muscle squelettique, menant à une insulino-résistance musculaire, sans forte altération de la sensibilité hépatique à l'insuline (104).

L'absorption du glucose par le muscle *via* les transporteurs GLUT4 constitue un indicateur de la sensibilité musculaire à l'insuline. En comparaison des souris témoins exprimant ERα et ERβ, les souris déficientes pour ERβ et ERα sont caractérisées respectivement par une augmentation et une diminution des niveaux de GLUT4 dans le muscle squelettique (105). Ces résultats suggèrent que l'insulino-résistance liée à la diminution de la sensibilité à l'insuline dans le muscle squelettique observée dans les modèles de souris ERα-KO serait liée à l'activation d'ERβ (105). Ceci amène à penser que dans un contexte physiologique, le déséquilibre du rapport entre ERα et ERβ conduisant à une suractivité d'ERβ pourrait réguler négativement GLUT4 et provoquer une résistance à l'insuline dans le muscle (**Figure 30**).

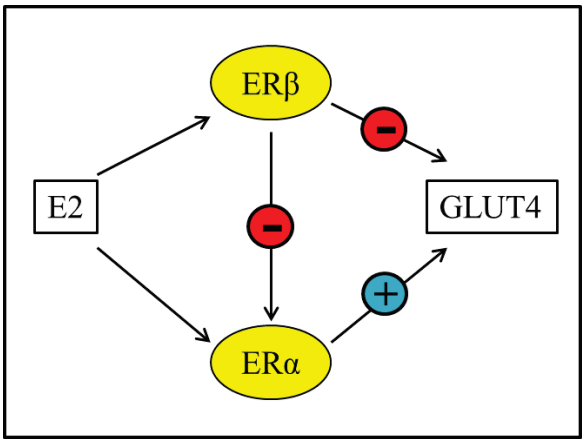


Figure 30 : Modèle représentant les mécanismes par lesquels ERα et ERβ pourraient moduler l'expression de GLUT4 dans le muscle (d'après Barros RP., 2006 (106)).

L'invalidation du récepteur ERβ chez la souris femelle nourrie au régime gras conduit à un gain de poids par augmentation de la masse grasse concomitante d'une amélioration de la sensibilité à l'insuline et de la tolérance au glucose (107) (**Figure 28**). Ces phénomènes dépendent de l'activation de *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPARγ), facteur de transcription jouant un rôle majeur dans la régulation du métabolisme du glucose et des lipides en modulant l'homéostasie énergétique dans le tissu adipeux, le muscle squelettique et le foie. Ainsi, l'inhibition de PPARγ dans le modèle de souris ERβ-KO réverse le phénotype métabolique, montrant une baisse d'expression des gènes cibles de PPARγ (Lpl, PEPCK, CD36 et adiponectine), associée à une insulino-résistance et une intolérance au glucose. Ceci signifie que chez la femme, ERβ pourrait inhiber la régulation du métabolisme médiée par PPARγ.

2.3.2.4 *Cellule bêta et survie*

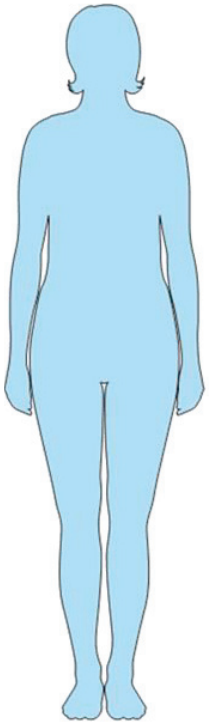
L'insulino-résistance expose le pancréas à divers stress comme la glucotoxicité, la lipotoxicité et le stress oxydatif menant à l'apoptose des cellules β. L'E2, à des concentrations physiologiques, joue un rôle antiapoptotique. Il a été montré *in vivo* sur des souris que le traitement par la streptozotocine (STZ), qui est un agent cytotoxique pour le pancréas, induit l'apoptose des cellules β, et que l'E2 circulant agit comme protecteur, prévenant l'apoptose des cellules β à des doses physiologiques. Le mécanisme passe par la fixation d'E2 au récepteur ERα (108).

La perte d'expression de GPER ($GPER^{-/-}$) prédispose également à l'apoptose des îlots induite par le modèle STZ (109), alors que l'activation pharmacologique de GPER par un agoniste sélectif (G1) protège du stress oxydatif et de l'apoptose dans des cultures d'îlots humains et murins (110). De plus, une autre étude a montré que des souris $GPER^{-/-}$ présentent une altération de la libération d'insuline induite par le glucose (GSIS) dans des îlots isolés stimulés par une concentration pharmacologique d'E2 (111). L'E2 est aussi capable de stimuler le GSIS par sa fixation sur ERβ qui initie la fermeture des canaux K^+ (revoir **Figure 8** pour les mécanismes de sécrétion de l'insuline par la cellule β).

De plus, il a été montré que l'E2 pouvait stimuler la synthèse de l'insuline *via* un mécanisme dépendant d'ERα. En effet, la synthèse d'insuline est fortement réduite chez la souris KO pour ERα spécifiquement dans le pancréas (112). De manière intéressante, ces mêmes travaux suggèrent que les effets de l'E2 sur le pancréas dépendraient d'un mécanisme d'action non génomique. En effet, l'utilisation d'une forme mutée d'ERα incapable de se fixer sur

l'élément de réponse aux œstrogènes (ERE) n'empêche pas la stimulation de la synthèse d'insuline par l'E2.

Un aperçu global des effets métaboliques de l'activation des récepteurs aux œstrogènes chez le sexe féminin est présenté ci-dessous (**Figure 31**).



Tissus	ERa	ERb	GPER
SNC	↘ prise alimentaire ↗ dépense énergétique ↘ obésité	↘ prise alimentaire ↗ dépense énergétique ↘ obésité	↘ prise alimentaire ↘ obésité
Foie	↗ sensibilité à l'insuline ↘ production hépatique de glucose ↘ lipogenèse	↘ TG ↘ LDL ↘ stéatose ↘ lipogenèse de novo ↘ lipolyse	↘ lipogenèse ↘ inflammation ↘ production hépatique de glucose ↗ oxydation des lipides
Pancréas (îlots)	↗ survie cellules bêta ↗ synthèse d'insuline ↗ GSIS ↘ lipogenèse	↗ survie ↗ GSIS	↗ survie cellules bêta ↗ sécrétion d'insuline ↘ lipogenèse
Tissu adipeux blanc	↘ masse grasse ↘ adipogenèse ↘ absorption des AGL ↘ lipogenèse ↗ lipolyse ↗ distribution sous-cutanée	↘ PPAR gamma ↘ adipogenèse ↘ lipogenèse ↘ masse grasse ↗ biogenèse mitochondriale (browning)	↘ taille adipocytes ↘ inflammation ↘ lipogenèse ↗ oxydation des lipides
Tissu adipeux brun	↗ thermogenèse ↗ dépense énergétique	↗ lipolyse ↗ thermogenèse ↗ biogenèse mitochondriale	↗ thermogenèse ↗ dépense énergétique
Muscle squelettique	↗ sensibilité à l'insuline ↗ GLUT4 ↗ oxydation des lipides	↘ sensibilité à l'insuline ↘ GLUT4	↘ inflammation ↘ lipogenèse ↗ oxydation des lipides ↗ absorption du glucose

Figure 31 : **Effets métaboliques de l'activation des récepteurs aux œstrogènes chez le sexe féminin.** TG : Triglycérides, LDL : Low Density Lipoprotein, GSIS : Glucose Stimulated Insulin Secretion, PPAR : peroxisome proliferator-activator. (adapté de Mauvais-Jarvis F., 2011 (59); Sharma G., 2017 (113))

3 Le concept de perturbation endocrinienne (PE)

3.1 Historique

Dans les années 1950, l'américaine Rachel Carson - écologiste et biologiste marine – s'intéresse aux conséquences écologiques de l'utilisation des pesticides. Elle met en évidence la toxicité reproductive du dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) – insecticide le plus utilisé à partir de la Seconde Guerre mondiale - chez le pygargue à tête blanche (l'aigle américain). Cette substance chimique rendait les coquilles d'œuf plus fines, qui se brisaient au moment de la couvaison, entrainant un déclin marqué de la population. L'effondrement de la population de pygargues a conduit Carson à publier en 1962 un livre intitulé *Printemps silencieux*. Ce manifeste activiste provoqua une prise de conscience des problèmes liés aux pesticides et à la pollution de l'environnement, renforçant le mouvement écologiste naissant dans les années 1960. Il a non seulement permis de conduire à la création de *l'Environmental Protection Agency* (EPA) en 1970, mais aussi d'interdire la production du DDT en 1972. D'autres observations d'effets négatifs sur la faune ont été rapportées. Par exemple, Guillette *et al.* ont rapporté qu'un déversement important de produits chimiques (dicofol, DDT et DDE) par la société *Tower Chemical Company* dans le lac Apopka de Floride était à l'origine d'effets « féminisants » chez les alligators vivant dans cette région (114). Les mâles présentaient un micropénis associé à une infertilité, tandis que les femelles développaient des anomalies ovariennes. La chute progressive de la population des alligators dans cette région a pu être corrélée à la baisse des naissances combinée à l'augmentation de la mortalité chez les nouveau-nés (115).

Ces accidents écologiques ont amené zoologistes, biologistes de la reproduction et autres chercheurs dont Theo Colborn et ses collaborateurs à proposer le concept de PE lors de la conférence de Wingspread en juillet 1991. En 1997, l'EPA définissait dans un rapport d'évaluation des risques le PE comme : « un agent exogène capable d'interférer avec la synthèse, le stockage, la sécrétion, le transport, le métabolisme, la liaison ou l'élimination des hormones endogènes naturellement produites par l'organisme et responsable du maintien de l'homéostasie, des phénomènes de reproduction et/ou du développement. ». Sa définition reste encore débattue, et celle qui est retenue à ce jour est celle définie en 2002 par l'OMS :

« Un perturbateur endocrinien est une substance ou un mélange de substances, qui altère les fonctions du système endocrinien et de ce fait induit des effets néfastes dans un organisme intact, chez sa progéniture ou au sein de (sous)-populations ».

La prise de conscience des effets négatifs des molécules anthropiques sur l'Homme et son environnement a conduit l'Union européenne (UE) à établir en 2006 un règlement concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des produits chimiques : REACh (Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals). Andreas Kortenkamp et ses associés ont rédigé à la demande de la Commission européenne un état des lieux sur l'évaluation des PE. Le rapport a été rendu en 2011 et reprend beaucoup des conclusions du rapport de l'OMS de 2002. Un an plus tard, l'OMS demande à certains chercheurs dont Åke Bergman de rédiger un nouveau rapport pour faire un nouvel état des lieux sur l'exposition et les effets des PE.

En 2009, l'UE adopte un cadre réglementaire pour la commercialisation et l'utilisation des pesticides. A partir de cette réglementation, la Commission européenne avait, jusqu'en décembre 2013, pour légiférer sur les perturbateurs endocriniens. Entre-temps, les industries des pesticides et de la Chimie ont réussi à bloquer cette législation en demandant une étude sur l'impact social et économique de l'interdiction de certaines substances. En réponse aux industriels, la Suède ainsi que d'autres pays ont traduit devant la justice la Commission européenne pour inaction. Fin 2015, la Cour européenne de justice a jugé que la Commission avait enfreint le droit européen. Le 4 juillet 2017, les états membres de l'UE ont adopté une proposition de la Commission européenne visant à définir légalement les PE, prérequis indispensable pour en réglementer l'utilisation ou décider de leur interdiction. Mais cette proposition a ses limites puisqu'elle conditionne l'identification d'un perturbateur endocrinien à des effets néfastes « avérés » résultant d'un « mode d'action endocrinien ». Ceci signifie qu'il faut attendre de rassembler un niveau élevé de preuves scientifiques avant de pouvoir limiter l'utilisation de produits chimiques soupçonnés dangereux pour la santé, ce qui va à l'encontre du principe de précaution et de prévention des risques. En effet, avec cette réglementation, les perturbateurs « présumés » et « soupçonnés » ne sont pas reconnus, alors qu'ils constituent aujourd'hui une large majorité des PE.

3.2 Liste des PE

Il existe plusieurs listes de polluants incluant des PE dont l'*EU pesticide database*, la *SIN (Substitue It Now !) list* ou encore la liste TEDX (116) qui est actuellement la plus longue et recense pas moins de 1482 molécules susceptibles d'interférer avec les récepteurs aux hormones, la synthèse des hormones ou leur conversion. Cependant seulement une petite partie d'entre eux ont été testés pour leurs propriétés endocriniennes sur un organisme intact (117). Selon leur nature chimique, on peut considérer les substances naturelles et les substances synthétiques.

Des exemples de PE d'origine naturelle incluent la pilule contraceptive, mais aussi les hormones d'origine végétale appelées phytoœstrogènes qui, du fait de leur structure moléculaire similaire à l'œstradiol, sont capables de produire des effets œstrogéno-mimétiques.

La plupart des PE sont des molécules d'origine anthropique utilisées dans l'industrie (agents de nettoyage, plastifiants, …), l'agriculture (pesticides) et les produits de consommation courante (cosmétiques, produits d'entretien, emballages, …). Dans cette catégorie apparaissent également les dioxines qui sont des sous-produits des incinérateurs de déchets, les hormones de croissance données aux animaux d'élevage (interdits dans l'Union européenne depuis 1988) et certains additifs utilisés en alimentation animale. En fonction de leur demi-vie, on pourrait aussi les subdiviser en polluants organiques persistants (POP) et en polluants chimiques moins persistants (**Figure 32**).

Les POP possèdent une combinaison de propriétés physico-chimiques qui font qu'une fois libérés dans l'environnement :

- Ils sont peu métabolisés. Leur demi-vie varie de plusieurs semaines à plusieurs dizaines d'années. Par exemple, la demi-vie de la dioxine de Seveso (TCDD) a été estimée, chez l'Homme, entre 7 et 9 ans (118).
- D'être distribués très largement dans les différents compartiments de l'environnement (air, sols, eaux).
- De s'accumuler dans le tissu adipeux des organismes vivants. On assiste donc à leur bioaccumulation au travers de la chaîne alimentaire. On va les retrouver essentiellement dans le lait, le fromage, la viande, les œufs et les poissons gras.

Produits chimiques	Exemples	Sources	Voies d'exposition	Demi-vie	Effets métaboliques démontrés	Références
Polluants organiques persistants (POP)						
Pesticides	DDT et ses métabolites	Accumulation dans les sols et les sédiments ; bioaccumulation au travers de la chaîne alimentaire	ingestion, inhalation, contact cutanée	6-10 ans	Altération de l'homéostasie glucidique et du métabolisme des lipides dans le foie Intolérance au glucose, hyperinsulinémie, dyslipidémie et altération du métabolisme des acides biliaires	(248) (249)
Dioxines	TCDD	Sous-produits issus de processus industriels mais aussi naturels comme les éruptions volcaniques et les feux de forêt.	ingestion, inhalation	7-11 ans	↑ Stéatose hépatique ↑ Fibrose hépatique ↑ Différenciation adipocytaire	(250) (251) (252)
Polychlorobiphényles (PCB)	PCB153 (non dioxin-like), PCB77 (dioxin-like)	Mélanges de molécules synthétiques anthropiques, largement utilisés dans les équipements électriques, les solvants d'encre et en particulier les plastifiants jusqu'en 1978. La consommation alimentaire est responsable de plus de 90% de l'exposition totale aux PCB.	ingestion, inhalation, contact cutanée	12 j - 16 ans	↑ Différenciation des adipocytes (in vitro) + ↑ poids corporel et hypertrophie des adipocytes ↑ Stéatose hépatique + ↑ adiposité viscérale dans un contexte d'une alimentation riche en lipides	(252) (253) (254)
Composés Perfluorés (PFC)	PFOA	Les PFC ont été détectés dans les emballages alimentaires, les meubles, les vêtements, les batteries de cuisine et les surfaces anti-adhésives pour repousser la graisse et l'huile.	ingestion, inhalation	2-4 ans	↑ Leptine et insuline; Surpoids après une exposition in utero	(255)
Retardateurs de flamme polybromés	Penta-BDE	Utilisés dans une large variété de matériaux, dont les meubles, l'électronique et la construction de matériaux en tant que retardateurs de flamme.	ingestion, inhalation, contact cutanée	2-4 ans	↓ Oxydation du glucose	(256)
Les PE non persistants						
Dérivés phénoliques	BPA-BPS	Composés organiques synthétiques utilisés principalement comme plastifiant. Il sont fréquemment détéctés dans les bouteilles d'eau, les emballages alimentaires et les boîtes à base de métal. L'ampleur de l'exposition humaine au BPA est illustrée par l'observation que 93% des américains ont des taux urinaires mesurables.	ingestion, inhalation, contact cutanée	4-5 h	Activités estrogéniques Altération de la fonction des cellules β pancréatiques et de la signalisation de l'insuline dans le foie (BPA) Induction de l'accumulation des lipides et de la différenciation (in vitro, BPS)	(257) (258) (259) (260)
Phtalates	DBP, DEHP	Les phtalates ont été largement utilisés dans la fabrication du PVC et dans les produits à base de vinyle. Par conséquent ils sont identifiés dans de nombreux produits ménagers, incluant des sucettes, jouets pour enfants, emballages alimentaires, équipement médical et ameublement. L'exposition dérive principalement des sources alimentaires pour les phtalates de haut poids moléculaire (ex : DEHP) et non alimentaires pour les phtalates de faible poids moléculaire (ex : DBP)	ingestion, inhalation, contact cutanée	≈ 12h	Effets antiandrogéniques Héritage transgénérationnel de l'obésité ↑ Différenciation des adipocytes	(261) (262) (199) (126)
Organoétains	TBT	Principalement utilisé comme biocide dans les revêtements des coques des bateaux et comme stabilisateur de chaleur dans le PVC. Il peut aussi être retrouvé dans les poussières de maison.	ingestion	15-77j	Induction de la différenciation des adipocytes ↑ Poids corporel + stéatose hépatique Effets transgénérationnels sur les dépôts de masse grasse et la stéatose hépatique.	(263) (182) (264)

Figure 32 : Liste non exhaustive de perturbateurs endocriniens affectant le métabolisme énergétique (d'après Gore AC., 2015 (119); Le Magueresse-Battistoni B., 2017 (120)).

La bioaccumulation des polluants dans le tissu adipeux expose l'organisme à une toxicité chronique interne qui évolue en fonction de plusieurs facteurs dont l'âge et la charge pondérale. Ainsi, les pertes importantes de poids chez les personnes obèses vont provoquer le relargage des polluants dans la circulation sanguine et leur redistribution dans les tissus. L'équipe de Tremblay *et al.* au Canada a montré qu'une perte de poids modérée chez des patients obèses ayant suivi un régime amaigrissant était associée à une augmentation des concentrations dans le plasma et le tissu adipeux sous-cutané de PCB et de pesticides organochlorés (121). De la même manière, ces effets ont été observés en cas de perte de poids par chirurgie bariatrique (122,123). Par exemple, dans l'étude de Hue *et al.*, les hommes en état d'obésité morbide (IMC $\geq$ 40 kg/m²) ont vu leur concentration plasmatique en pesticides organochlorés multipliée par 5 suite à la chirurgie, passant de 295,1 µg/kg avant la chirurgie à 1440,8 µg/kg un an après la chirurgie (122). Ces résultats suggèrent que le tissu adipeux jouerait un rôle protecteur en servant de réservoir de stockage des polluants lipophiles, empêchant leur distribution dans d'autres tissus où ils pourraient exercer des effets délétères.

Sous l'égide du Programme des Nations Unies pour l'Environnement (UNEP), la convention de Stockholm signée en 2001 par 151 pays dont la France, visait à réduire voire éliminer la production de certains pesticides, produits chimiques industriels et sous-produits dangereux pour l'espèce humaine mais aussi pour la faune et la flore. La convention visait au départ à bannir 12 POP, comprenant 9 pesticides, 2 produits chimiques industriels et les sous-produits non intentionnels issus de l'incinération de PCB (**Figure 33**). En 2009, de nouvelles molécules ont été ajoutées.

Sources	Substances	Production	Utilisation
Pesticides	Aldrine	Arrêt	Insecticide
	Chlordane	Arrêt	Insecticide
	DDT	Restriction	Insecticide
	Dieldrine	Arrêt	Insecticide
	Endrine	Arrêt	Pesticide
	Heptachlore	Arrêt	Pesticide
	Hexachlorobenzène (HCB)	Arrêt	Fongicide
	Mirex	Arrêt	Insecticide, retardateur de feu, additif pour plastique
	Toxaphène	Arrêt	Insecticide
	Alpha-hexachlorocyclohexane	Arrêt	Insecticide
	Bêta-hexachlorocyclohexane	Arrêt	Insecticide
	Chlordécone	Arrêt	Pesticide
	Hexachlorobutadiène	Arrêt	Insecticide, herbicide
	Lindane	Arrêt	Insecticide
	Pentachlorobenzène	Arrêt	Fongicide
Produits chimiques industriels	Hexachlorobenzène (HCB)	Arrêt	Caoutchoucs synthétiques, plastifiant (PVC)
	Polychlorobiphényles (PCB)	Arrêt	Isolant électrique
	Hexabromobiphényle	Arrêt	Retardateur de flammes dans les produits plastiques
	Hexabromodiphényléther et Heptabromodiphényléther	Arrêt	Retardateur de flammes dans les produits plastiques
	Pentachlorobenzène	Arrêt	Retardateur de flammes dans les fluides diélectriques
	Tétrabromodiphényléther et Pentabromodiphényléther	Arrêt	Retardateurs de flammes dans les matières plastiques et les textiles
Sous-produits	Polychlorodibenzo-p-dioxines (PCDD)	Non intentionnelle	Déchet industriel
	Polychlorodibenzofuranes (PCDF)	Non intentionnelle	Déchet industriel
	Hexachlorobutadiène	Non intentionnelle	Déchet industriel
	Pentachlorobenzène	Non intentionnelle	Déchet industriel

Figure 33 : Liste des POP dont l'utilisation est interdite par la convention de Stockholm depuis 2001, comprenant les 12 premiers visés par la convention (en clair) et ceux ayant fait l'objet d'une évaluation plus récente (en foncé).

Contrairement aux POP, certains polluants environnementaux comme les dérivés phénoliques ont une faible bioaccumulation du fait de leur métabolisation plus rapide. Cependant, ils représentent un véritable problème dans la mesure où l'exposition humaine à ces composés est continue. La production massive du bisphénol A (BPA) et des phtalates par l'industrie du plastique rendent compte du caractère omniprésent de ces molécules qui peuvent, sous l'action de la chaleur par exemple, passer du contenant (l'emballage alimentaire) au contenu

(l'aliment) et causer des contaminations. Par exemple, le BPA a été retrouvé dans les urines de 92% d'un échantillon représentatif de la population des Etats Unis (124). Après une exposition orale, le BPA est rapidement métabolisé chez l'Homme par le foie en une forme conjuguée inactive de demi-vie courte, éliminée dans les urines au bout de 6 heures (125). Chez le rongeur, la cinétique d'élimination du BPA est plus lente parce que la forme conjuguée peut être réabsorbée par le foie en suivant la circulation dite entéro-hépatique, contribuant à la rétention de plus fortes concentrations de BPA dans le sang au cours du temps.

Comme les bisphénols, les phtalates sont métabolisés dans le foie (**Figure 34**) et rapidement excrétés dans les urines (au bout de 24 heures). La source d'exposition humaine aux phtalates dépend de leur poids moléculaire. Ainsi l'exposition aux phtalates de haut poids moléculaire se fait principalement par l'ingestion d'aliments contaminés. En effet, Koch et ses collaborateurs se sont aperçus que les concentrations urinaires en di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), di-iso-nonyl phthalate (DiNP) et di-iso-decyl phthalate (DiDP) - phtalates de haut poids moléculaire - diminuaient au cours d'un jeûne de 48 h, puis ré-augmentaient à la suite de l'ingestion d'un repas (126). Pour les phtalates de faibles poids moléculaire, l'exposition se fait essentiellement *via* les produits d'hygiène, la poussière et l'air intérieur.

Molécules parents	abbr.	Métabolites	abbr.
Phtalates de haut poids moléculaire			
Di (2-ethylhexyl) phthalate	DEHP	Mono-(2-ethylhexyl) phthalate	MEHP
		Mono-(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate	MEHHP
		Mono-(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate	MEOHP
Di-n-octyl phthalate	DnOP	Mono-n-octyl phthalate	MnOP
Di-iso-nonyl phthalate	DiNP	Mono-iso-nonyl phthalate	MiNP
Di-iso-decyl phthalate	DiDP	Mono-iso-decyl phthalate	MiDP
Phtalates de faible poids moléculaire			
Dimethyl phthalate	DMP	Mono-methyl phthalate	MMP
Diethyl phthalate	DEP	Mono-ethyl phthalate	MEP
Di-cyclohexyl phthalate	DCHP	Mono-cyclohexyl phthalate	MCHP
Di-n-pentyl phthalate	DNPP	Mono-n-pentyl phthalate	MnPP
Butyl-benzyl phthalate	BBzP	Mono-benzyl phthalate	MBzP
Di-n-hexyl-phthalate	DnHP	Mono-hexyl phthalate	MHP
Di-iso-butyl phthalate	DiBP	Mono-iso-butyl phthalate	MiBP
Di-n-butyl phthalate	DnBP	Mono-n-butyl phthalate	MnBP

Figure 34 : Les phtalates et leurs principaux métabolites. Les molécules listées comme polluants prioritaires par l'USEPA sont indiquées en rouge (d'après Wang W., 2018 (127)).

3.3 Les modes d'action des PE

Plusieurs mécanismes d'action des PE ont été décrits.

3.3.1 La perturbation de la synthèse, du transport, du métabolisme et de l'excrétion de l'hormone

- Certains PE peuvent perturber la synthèse hormonale. Par exemple, le BPA à forte concentration (100 µM) inhibe l'aromatase, enzyme indispensable à la conversion des androgènes en œstrogènes (128).
- Certains PE peuvent altérer la liaison aux protéines de transport des hormones. *In vitro*, certains retardateurs de flammes bromés comme le tetrabromobisphénol A (TBBPA) sont capables de se fixer sur la protéine de transport de la thyroxine (T4) appelée transthyrétine avec une affinité supérieure à celle de l'hormone thyroïdienne elle-même (129).
- Certains PE peuvent modifier le métabolisme des hormones. En effet, le TBBPA stimule l'expression d'UGT1A1, enzyme de phase II inactivant la T4 par glucuronidation et participant à la diminution de sa concentration plasmatique (130).

3.3.2 L'action dite « agoniste »

En se fixant au récepteur, le PE peut mimer l'action de l'hormone naturelle et activer ou inhiber la transcription de gènes cibles. On parle alors d'effet agoniste. Ainsi, un grand nombre de PE miment l'action des œstrogènes au niveau de leurs récepteurs. Ce sont des xénoœstrogènes ou œstrogéno-mimétiques (**Figure 35**). Par exemple le BPA imite l'action de l'E2 dans les cellules de cancer de l'ovaire BG-1 (131).

Molécules	Utilisation
Substances naturelles	
Estradiol, estrone, estriol	Synthèse naturelle
Coumestrol, génistéine	Phyto-estrogènes
Substances synthétiques	
Aldrine, Dieldrine, Chlordécone	Insecticides
Ethynil-estradiol, DES	Pharmacologie
Bisphénol A	Plastifiant
Nonylphénol, PCB	Industrie
Tamoxifène	SERM
Furanes	Solvants, déchets industriels
Atrazine	Pesticide, herbicide
Zéaralénone	Mycotoxine
Tributylétain	Pesticide, antifouling

Figure 35 : Liste de substances aux propriétés œstrogéno-mimétiques. SERM : Selective Estrogen Receptor Modulator.

3.3.3 L'action dite « antagoniste »

En rentrant en compétition avec l'hormone naturelle sur son récepteur, le PE peut bloquer et empêcher l'action de celle-ci. On parle alors d'effet antagoniste. Ainsi, il a été montré que le BPA pouvait empêcher la fixation de la triiodothyronine (T3) sur son récepteur et induire parallèlement le recrutement d'un répresseur de la transcription, résultant en la suppression de l'expression des gènes cibles (132).

3.3.4 Les SERM

Une molécule donnée peut présenter des effets agonistes ou antagonistes selon le tissu dans lequel elle va agir. Cette propriété présente un intérêt clinique puisque cela ouvre la possibilité de conserver les effets bénéfiques de l'action de la molécule sur un tissu tout en minimisant les effets secondaires. Des ligands modulateurs du récepteur des œstrogènes (de l'anglais SERM pour *Selective Estrogen Receptor Modulator*) peuvent être sélectifs d'un tissu donné. Un des exemples de SERM le plus couramment utilisé en clinique est probablement le tamoxifène. Possédant une action anti-œstrogénique par inhibition compétitive de la liaison au ligand sur son récepteur, le tamoxifène présente un intérêt dans le cadre du traitement du cancer du sein hormono-dépendant. En même temps, il exerce une action proœstrogénique sur

certains tissus dont l'os en maintenant la densité osseuse. Cette propriété est utilisée particulièrement chez les femmes ménopausées, dont le déficit en œstrogènes favorise le risque d'ostéoporose (133).

3.4 Les caractéristiques des PE

L'origine de la toxicologie moderne provient des observations d'Hippocrate qui a été le premier à montrer que selon la dose et le mode d'administration, une substance passe du remède au poison et inversement. Ce principe de la dose a ensuite été repris par le médecin alchimiste Paracelse au XVe siècle, connu pour sa célèbre citation : « Toutes les choses sont poison, et rien n'est poison ; seule la dose fait qu'une chose n'est pas poison. ». Cette citation lui a largement survécu, et aujourd'hui le principe de la relation proportionnelle entre la dose et la toxicité est toujours utilisé pour évaluer les risques liés aux substances chimiques de synthèse. L'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) a traduit les propos de Paracelse ainsi : « Plus la dose absorbée d'un produit chimique est élevée, plus l'effet est important, ainsi que la probabilité d'un effet indésirable. » En clair, à petites doses, petits effets, et à fortes doses, effets importants.

Ainsi, l'évaluation des risques repose sur les principes de toxicologie et la linéarité des effets nocifs des produits chimiques au-delà de valeurs de référence. Ces références sont regroupées sous le terme de valeurs toxicologiques de référence (VTR). Parmi ces références on retrouve la dose journalière admissible ou dose journalière tolérable (DJA/DJT) qui correspond à la quantité de substance qu'un individu peut ingérer quotidiennement sans risque pour sa santé. Le calcul de la DJT repose sur l'extrapolation de la Dose Sans Effet (DSE) ou No Observable Adverse Effect Level (NOAEL) déterminée expérimentalement chez l'animal, auquel on applique un facteur de correction tenant compte des variations inter-individuelles, inter-espèces et des données de la littérature. Ce facteur varie de 100 à 1000.

$$DJT = \frac{DSE\ (ou\ NOAEL)}{100 \text{ à } 1000}$$

Cependant, avec le concept de PE, ce principe est remis en cause. En effet, la perturbation endocrinienne se situe à l'interface entre l'endocrinologie et la toxicologie. Analyser ce qu'est une perturbation endocrinienne nécessite de prendre en considération un certain nombre de caractéristiques du système endocrinien. En particulier, on sait que le système endocrinien répond à des **concentrations hormonales très faibles** (10^{-12} mol/L) et initie une **réponse**

biologique non linéaire entre les niveaux d'hormones et l'occupation des récepteurs. On parle de courbe dose-réponse non monotone. De plus, on sait que les effets seront d'autant plus marqués que la fonction endocrine ciblée sera immature au moment de l'exposition, c'est-à-dire pendant les **périodes fœtale et néonatale**. On sait aussi que les effets seront très **dépendants du sexe**.

3.4.1 Effets à faible dose

Pour comprendre les effets à faible dose des PE, il faut se familiariser avec le concept de base en endocrinologie qui dit que le principe de l'effet biologique des hormones repose sur l'occupation des récepteurs. Welshons et ses collègues (134) décrivent comment la concentration d'hormones influe sur l'occupation des récepteurs : « Aux concentrations supérieures au Kd (la constante de dissociation pour laquelle 50% des récepteurs sont occupés par le ligand), la réponse est saturée en premier, et, ensuite, à des concentrations plus élevées, on observe une saturation des récepteurs. ». Cela signifie qu'à de faibles doses d'hormones, une concentration hormonale multipliée par 10 peut multiplier par 9 le taux d'occupation des récepteurs ; tandis qu'à des doses élevées, une concentration hormonale multipliée par 10 multiplie seulement de 1,1 fois l'occupation du récepteur (**Figure 36**). Ainsi, même des modifications modérées de la concentration d'hormones dans la plage des faibles doses peuvent entraîner des modifications substantielles de l'occupation du récepteur et donc des modifications importantes des effets biologiques. Ils notent également qu'une réponse biologique proche du maximum peut être observée sans taux d'occupation élevé du récepteur. Cette situation repose sur la théorie *spare receptor hypothesis* qui dit que le mécanisme de réponse sature avant que tous les récepteurs ne soient saturés.

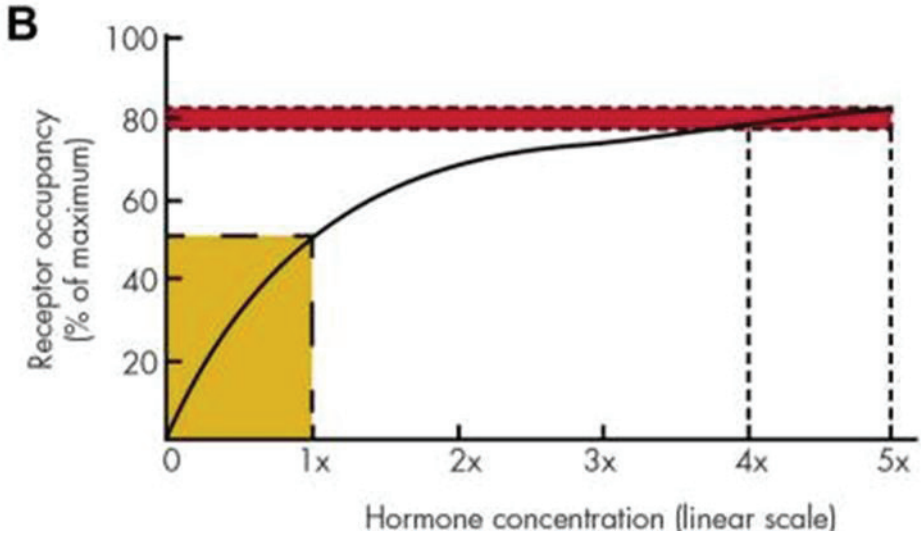


Figure 36 : **Exemple schématique de la relation entre l'occupation des récepteurs et la concentration hormonale**. Dans cet exemple, à des concentrations faibles, l'augmentation de la concentration par "x" (de 0 à 1x) augmente l'occupation des récepteurs d'environ 50% (de 0 à 50%, encadré jaune). La même augmentation de la concentration hormonale, à plus forte dose (de 4x à 5x), augmente l'occupation des récepteurs de seulement 4% (de 78 à 82%, encadré rouge) (d'après Vandenberg LN., 2012 (135)).

En raison de la similarité des mécanismes médiés par les récepteurs, il a été proposé que les PE imitant les hormones naturelles suivent les mêmes règles et aient donc des effets biologiques à faible dose. De même, les PE qui influent sur la production, le métabolisme, l'absorption ou la libération d'hormones ont également des effets à faibles doses, car même de petits changements dans la concentration d'hormones peuvent avoir des conséquences biologiquement importantes.

Selon les agences sanitaires nationales (ANSES) et européennes (EFSA), les faibles doses sont considérées comme des doses d'exposition inférieures au seuil réglementaire. En 2002, un panel d'experts de l'EPA avait défini les faibles doses sur la bases des « changements biologiques qui interviennent dans la gamme des expositions humaines ou à des doses plus faibles que celles utilisées typiquement dans le paradigme de tests standards de l'EPA pour évaluer la toxicité pour la reproduction et le développement » (136). Pour le BPA, Vom Saal et ses collaborateurs (137) ont défini les faibles doses selon 2 critères :

- Premièrement, les études sur l'animal doivent impliquer l'administration d'une dose inférieure à celle utilisée dans les études de toxicologie classique pour l'évaluation des risques. Cette dose (LOAEL pour Low Observable Adverse Effect Level) correspond à 50 mg/kg/j pour le BPA dans les études sur rats et souris, et sert de base au calcul de la DJT chez l'homme fixée par l'EPA à 50 µg/kg/j. Cependant, la mise en évidence d'effets

indésirables du BPA pour des doses inférieures à la DJT (138) a conduit l'EFSA à baisser cette DJT à 4 µg/kg/j en Europe.

La démonstration des effets à faible dose des PE (c'est-à-dire en deçà des VTR), bien que largement débattue, a une réelle importance en termes de santé publique puisque l'exposition à des doses de l'ordre de celles auxquelles est exposée la population générale peut avoir un impact pathologique. Par exemple, il a été montré chez le rat que l'exposition au BPA à des doses environnementales altérait le poids corporel et l'homéostasie du glucose (139). Dans cette étude, la plus faible dose de BPA administrée par gavage pendant la gestation et la lactation était de 50 µg/kg/j (soit la DJT), et qu'à cette dose, il a été observé une augmentation du poids corporel, de l'insuline plasmatique et de l'intolérance au glucose, alors qu'aucun effet indésirable n'était observé à des doses plus fortes (250 et 1250 µg/kg/j).

- Le 2e critère est que la dose doit se trouver dans une gamme d'exposition environnementale humaine typique. Par exemple, sur la base de la littérature sur les contaminations environnementales et alimentaires, l'absorption quotidienne de BPA par l'homme a été estimée à moins de 1 µg/kg/j (140).

3.4.2 Effets non monotones

Un concept relié aux faibles doses est celui de la non monotonicité des effets des PE. Une réponse monotone (linéaire ou non) se caractérise par une pente qui ne change pas de direction avec la dose dans une courbe dose-réponse. Ceci signifie que connaitre l'effet à forte dose permet de prédire l'effet à faible dose par extrapolation. Une courbe dose-réponse est dite non monotone (CDRNM) lorsque cette pente change de signe dans la gamme de dose testée. La plupart des CDRNM sont en forme de « U » (avec des réponses maximales à faibles et fortes doses) ou de « U » inversé (avec une réponse maximale au milieu de la gamme de concentration). D'autres CDRNM ont des formes plus complexes, impliquant plusieurs changements de signe de la pente dans la même gamme de dose (**Figure 37**). Cette non-linéarité des effets rend difficile voire impossible l'extrapolation de la courbe dose-réponse jusqu'à une dose sans effet.

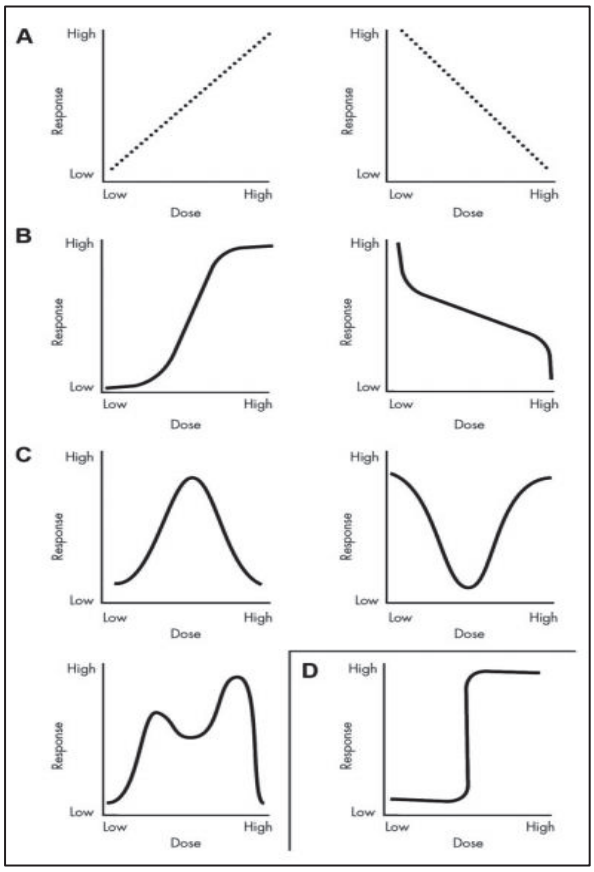


Figure 37 : **Exemples de courbes effet-dose**. A : Réponses linéaires positivement ou inversement associées à la dose. Ce type de courbe permet l'extrapolation de l'effet des différentes doses. B : Exemple de courbes non linéaires monotoniques. Dans ces exemples, la pente de la courbe ne change pas de signe, mais change de valeur. Connaitre l'effet d'une très forte ou très faible dose ne permet pas la prédiction de l'effet aux doses intermédiaires. Ces courbes possèdent généralement un intervalle de linéarité et permet les prédictions des effets dans la limite de cet intervalle. C : Trois courbes non-monotones dont une courbe en cloche ou en U et une courbe multi-phasique. Ces relations entre l'effet et la dose ne permettent pas de prédire l'effet à partir des doses testées. D : Réponse binaire. Aucun effet n'est observé jusqu'à une dose seuil, à partir de laquelle l'effet maximum est observé (d'après Vandenberg LN., 2012 (135)).

Un exemple d'effets non monotones des PE a été mis en évidence par Marmugi *et al.* en 2012 (141). Dans cette étude, les auteurs ont testé les effets du BPA *in vivo*. Pour cela, ils ont exposé, par voie orale, des souris mâles pendant 28 jours à différentes concentrations de BPA, incluant 0 (contrôle), 50 (DJT) et 5000 µg/kg/j (NOAEL). L'analyse transcriptomique du foie de ces souris a révélé que l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides était différente entre les groupes contrôle, DJT et NOAEL. Plus précisément, l'exposition au BPA à la DJT a eu un impact plus fort sur l'expression hépatique des gènes de la lipogenèse *de novo* qu'à la NOAEL, traduisant la présence d'effets non monotones.

3.4.3 Effets différés par rapport à l'exposition

Il existe des périodes de vulnérabilité très forte aux polluants comme le développement fœtal, la puberté, etc… qui sont des périodes caractérisées par des modifications hormonales importantes. En conséquence, l'âge, à l'exposition, est une notion importante dans l'étude des effets des PE. Ceci a introduit la notion de fenêtre de vulnérabilité. L'exemple historique du Distilbène ® (DES) est à l'origine de ce concept de fenêtre de vulnérabilité cité. Le DES est un puissant œstrogène de synthèse utilisé jusqu'en 1975 pour prévenir des fausses-couches. Malheureusement, son utilisation a entrainé chez les filles des mères exposées l'apparition de malformations du tractus génital, mais aussi des infertilités et des cancers hormono-

dépendants. Chez la descendance, les garçons présentent aussi des malformations, et des études récentes montrent que les générations suivantes sont également affectées, indiquant l'existence d'un effet transgénérationnel (142,143).

Ces études rappellent les travaux de Barker *et al.*, qui ont montré que des conditions environnementales délétères comme un stress, une carence nutritionnelle ou un déséquilibre métabolique, dans certaines périodes critiques du développement (fœtale, périnatale), favorisent à l'âge adulte la survenue d'une obésité, d'un syndrome métabolique et/ou d'un diabète de type 2. C'est ce que l'on appelle la théorie de programmation fœtale (Developmental Origin of Health and Disease [DOHaD]), qui suppose l'existence d'une fenêtre de vulnérabilité (144). L'exposition prénatale au DES a aussi des conséquences sur le métabolisme, et une obésité est notée sur des souris adultes exposées en période périnatale. Certains effets passent les générations et affectent donc des individus non exposés. Les mécanismes d'action passent alors par des modifications épigénétiques.

3.4.4 Effets cocktails

L'ubiquité des polluants chimiques dans notre environnement amène à un scénario d'exposition multiple dont il est plus difficile de prédire les effets sur notre organisme que ceux de chacun pris individuellement. On parle d' « effet cocktail » lorsque les substances chimiques en mélange entrainent un effet délétère alors que prises séparément, elles sont sans effet. Lorsque l'effet global du mélange est équivalent à celui de la somme de chaque polluant, on parle d'addition de doses (ou addition de concentrations). Si une interaction a lieu entre les composés du mélange, l'effet combiné peut être inférieur à celui attendu de la somme de chaque dose. On parle alors d'effet antagoniste. Si l'effet est supérieur à celui attendu de la somme des composés, on parle de synergisme (145,146).

- <u>L'addition des doses</u>

En 2000, Payne et ses collaborateurs ont voulu tester la prédictibilité des effets d'un mélange équimolaire de quatre composés œstrogéniques (o,p´-DDT, génistéine, 4-n-octylphénol et 4-nonylphénol) sur un modèle de levure en se basant sur l'activité de chacun des composés pris séparément sur ce même modèle (147). Ils ont pu observer que la courbe dose-réponse du mélange de 2 à 4 de ces composés suivait très bien celle prédite par le modèle d'addition des doses. En 2002, Silva *et al.* d'une part, et Rajapakse *et al.* d'autre part, ont étendu cette approche à l'étude des effets d'un mélange respectivement de 8 et 12 substances chimiques

(148,149). Dans les 2 cas, la prédiction des effets du mélange suivait bien le modèle d'addition des doses de chacun pris individuellement. De plus cette activité du mélange s'observe alors que chaque substance chimique est testée à des doses inférieures à la NOAEL. Plus tard, Ramirez *et al.* testèrent sur le même modèle de levure les effets d'un mélange de 2 composés œstrogéniques (BPA et génistéine) agissant sur la même cible (150). Ils en conclurent que l'utilisation du modèle d'additivité des concentrations est un bon modèle prédictif de l'effet global de la mixture des 2 composés chimiques.

Cette notion d'addition des doses a également été utilisé par l'OMS sous le terme de quantité équivalente toxique (**TEQ**) pour faciliter l'évaluation des risques relative à l'exposition à un mélange de dioxines et/ou de furanes et de PCB dioxin-like, puisque ces molécules partagent le même mode d'action par activation du récepteur à la dioxine (151). La TEQ représente la somme des concentrations des différents composants du mélange (Ci), multipliée par le facteur d'équivalence toxique de chaque composant ($TEFi$). Le TEF indique le degré de toxicité de chaque congénère par rapport à la dioxine de Seveso (2,3,7,8 TCDD), qui est la forme la plus toxique des dioxines, à laquelle une valeur de référence de 1 est attribuée. Cette relation est résumée par l'équation suivante :

$$TEQ = \Sigma\,[Ci] \times TEFi$$

- <u>Le synergisme</u>

Il a également été démontré, dans certaines conditions, que les effets d'un mélange de polluants pouvaient surpasser la simple addition des toxicités de chacun pris séparément. On peut traduire mathématiquement ce concept par la formule 1 + 1 > 2. Un exemple récent de la littérature est illustré par l'étude de Patrick Balaguer *et al.* (152,153), qui a montré que certains œstrogènes comme l'éthinylœstradiol ou EE2 (un des composants actifs des pilules contraceptives) et des pesticides organochlorés tels que le trans-nonachlor (TNC), bien que très faiblement actifs par eux-mêmes, ont la capacité de se fixer simultanément à un récepteur (PXR) situé dans le noyau des cellules et de l'activer de façon synergique (**Figure 38**). Pour se lier au récepteur aux xénobiotiques PXR, EE2 et TNC doivent être présents à de très fortes concentrations, et n'activent que faiblement ce récepteur. Le domaine de liaison au ligand de PXR est capable d'interagir avec les 2 composés en même temps, créant un ligand « supramoléculaire » possédant une affinité augmentée pour PXR et capable d'induire un effet toxique à des doses auxquelles chaque composé est inactif individuellement.

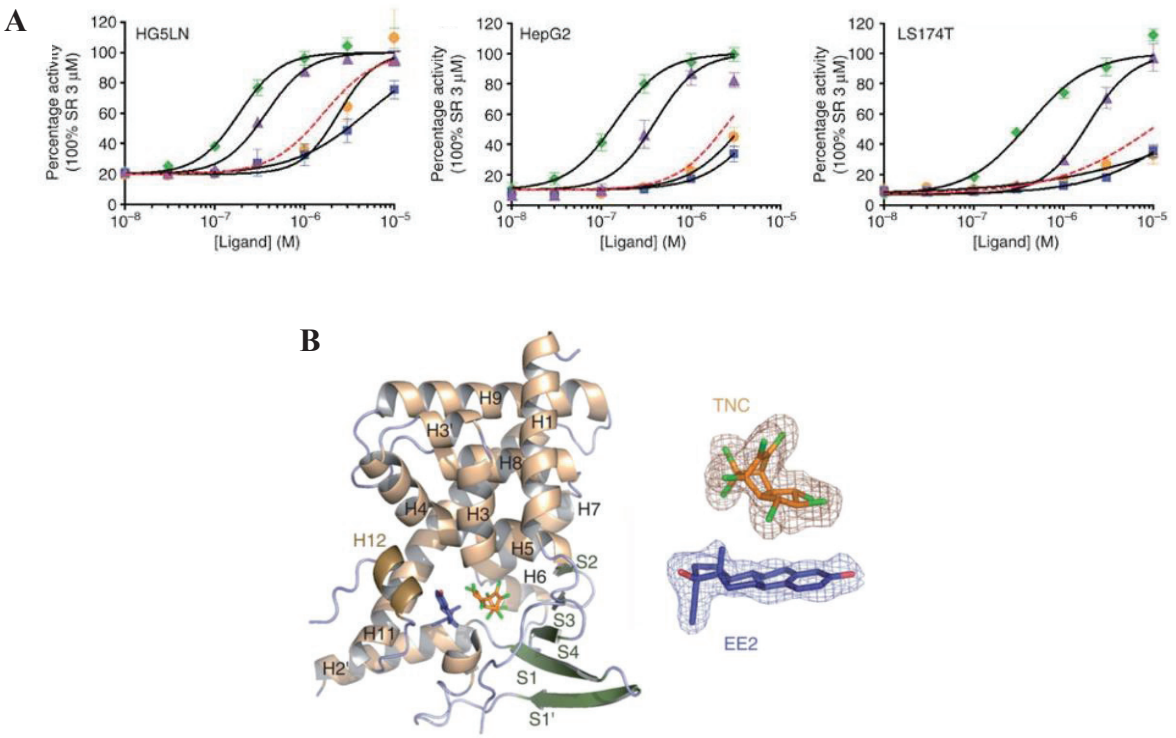


Figure 38 : **Activation synergique de PXR par un cocktail binaire de composés pharmaceutiques (EE2) et environnementaux (TNC)**. A) 3 lignées cellulaires exposées à des doses croissantes de SR12813 (vert), d'EE2 (bleu), de TNC (orange) et du mélange EE2+TNC (violet). B) Structure quaternaire du domaine de liaison au ligand de PXR avec EE2 (bleu) et TNC (orange) (adapté de Delfosse V., 2015 (152)).

4 Lien entre PE et perturbations métaboliques

4.1 Le métabolisme des xénobiotiques

Le devenir des polluants dans l'organisme passe par une succession de 4 étapes empruntées à la pharmacocinétique et regroupées sous l'acronyme ADME pour : Absorption, Distribution, Métabolisme et Elimination. Après ingestion, ces substances vont être absorbées au niveau de l'intestin grêle puis être distribuées vers le foie par la veine porte. A ce stade, les xénobiotiques se fixent sur leurs récepteurs pour induire l'expression de gènes impliqués dans les processus associés à leur biotransformation, leur absorption et leur élimination (**Figure 38**). Ces gènes codent pour de nombreuses enzymes dites de phase I et de phase II, ainsi que des transporteurs d'absorption et d'efflux (154).

4.1.1 Les récepteurs aux xénobiotiques et les PPAR

Aryl hydrocarbon Receptor (AhR), *Pregnane X Receptor* (PXR) et *Constitutive Androstane Receptor* (CAR) sont les trois principaux récepteurs aux xénobiotiques dans le foie. La découverte de ces récepteurs découle du concept selon lequel l'induction des enzymes de métabolisation par les xénobiotiques est médiée par un récepteur par le biais d'une machinerie de transcription, qui est issu de l'hypothèse dite «*induction-receptor*». La vraisemblance de cette hypothèse a fait un grand bond en avant avec la découverte du récepteur de la dioxine, également appelé récepteur AhR (155).

- AhR est un facteur de transcription activé par un ligand appartenant aux protéines de la famille des basic helix-loop-helix / Per-Arnt-Sim (bHLH / PAS). En absence de ligand, AhR réside dans le cytoplasme et forme des complexes avec des protéines chaperonnes et/ou des corépresseurs. Lors de la liaison à ses agonistes, le plus connu étant la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD), AhR se dissocie de son complexe cytoplasmique et se transloque dans le noyau, forme un hétérodimère avec son partenaire, le translocateur nucléaire AhR (ARNT), se lie aux éléments de réponse à la dioxine (DRE) situés dans le promoteur de ses gènes cibles comme des enzymes de phase I (CYP1A1) ou de phase II (UGT1A1) pour activer leur transcription (156).
- Les récepteurs aux xénobiotiques PXR et CAR ont été découverts en tant que «récepteurs orphelins» (157). Ils sont exprimés principalement dans le foie et l'intestin grêle où se trouvent leurs gènes cibles, et sont capables de lier une grande variété de produits chimiques structurellement variés comme des stéroïdes endogènes et

synthétiques et des agents pharmaceutiques. Lors de la liaison du ligand, PXR et CAR forment des hétérodimères avec le retinoid X receptor (RXR) et déclenchent la transcription de leurs gènes cibles. PXR et CAR peuvent partager non seulement leurs ligands, mais également de nombreux gènes cibles, y compris les enzymes de phase I, de phase II et des transporteurs impliqués dans l'élimination des xénobiotiques. A titre d'exemple, les gènes Cyp3a11 et Cyp2b10 codant pour des enzymes de phase I, constituent des gènes cibles respectivement de PXR (154) et CAR (158). Ces récepteurs nucléaires ont également été proposés pour réguler les gènes impliqués dans le métabolisme des endobiotiques, y compris la bilirubine, les acides biliaires et les hormones stéroïdes (159). En utilisant la technique de séquençage à haut débit de l'ARN (RNA-seq), Fu *et al.* ont pu quantifier et comparer l'abondance des ARNm de 304 gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques dans le foie et diverses sections de l'intestin chez la souris mâle adulte C57BL/6J (154). Cette large étude a permis de montrer que l'expression de 80% des gènes codant pour les enzymes de phase I, de phase II, les enzymes de synthèse de co-substrats de phase II, les transporteurs de xénobiotiques et les facteurs de transcription liés aux xénobiotiques dépend du tissu considéré (foie, intestin). De plus, parmi ces gènes, plus de la moitié est exprimée majoritairement dans le foie.

- Les *Peroxysome Proliferator Activated Receptors* (PPAR) appartiennent également à la grande famille des récepteurs nucléaires. Ce sont des facteurs de transcription dépendant de ligands comme les récepteurs aux œstrogènes (ER). Les acides gras endogènes, mais aussi certains ligands exogènes sont connus pour activer les PPAR (**Figure 39**). Les récepteurs PPAR sont représentés par 3 membres : PPARα, PPARβ/δ et PPARγ codés respectivement par les gènes NR1C1, NR1C2 et NR1C3. Comme pour CAR et PXR, la fixation du ligand sur le LBD de PPAR permet la formation d'un hétérodimère avec RXR. Ce dimère se fixe sur la région promotrice de l'élément de réponse aux PPAR (PPRE) et permet le recrutement de co-activateurs. Ceci résulte en une augmentation de la transcription de nombreux gènes impliqués dans différents processus biologiques, dont Cyp4a qui code pour une enzyme de phase I du métabolisme des xénobiotiques (160).

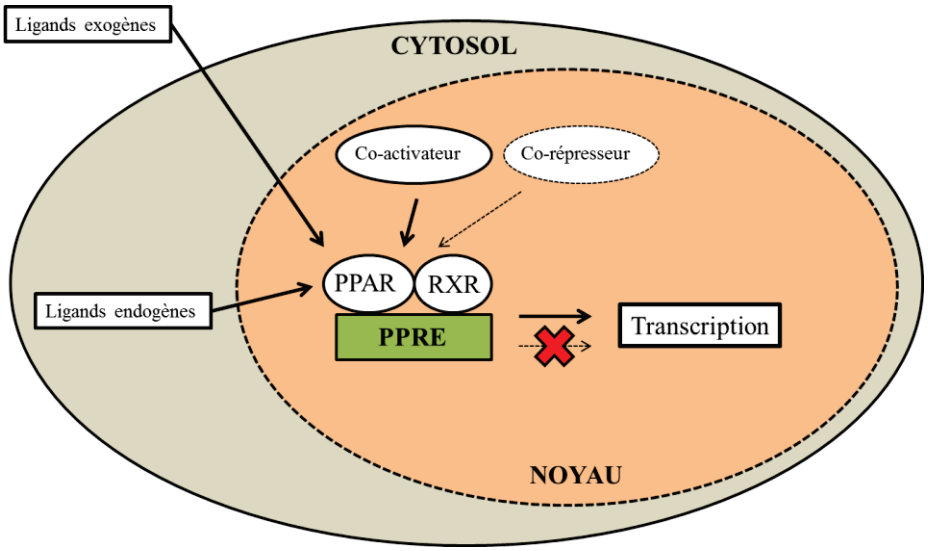


Figure 39: Mécanismes de transcription génique médiés par PPAR. Lorsque PPAR est dissocié de son ligand, il interagit avec un co-répresseur qui inhibe la transcription génique. Lors de la liaison de ligands exogènes (ex : médicaments ou polluants) ou endogènes (ex : acides gras), PPAR hétérodimérise avec RXR et recrute le coactivateur, permettant la transcription de divers gènes (adapté de Kota BP., 2005 (161)).

4.1.2 Les enzymes de phase I

Les enzymes de phase I catalysent les réactions d'hydrolyse, de réduction et d'oxydation des xénobiotiques, et introduisent des groupes réactifs et polaires dans leurs substrats. Parmi ces réactions, l'oxydation conduisant à l'addition d'un ou plusieurs atomes d'oxygène à la molécule parente est la plus fréquente. Les cytochromes P450 (CYP450) constituent le groupe principal des enzymes qui modifient chimiquement les xénobiotiques en produits solubles dans l'eau, ce qui facilite leur excrétion par les reins et/ou le foie. Parmi les CYP450 présents dans le foie humain, ceux appartenant aux familles 1, 2 et 3 et en particulier CYP3A4 (CYP3A11 chez la souris) possèdent le plus fort potentiel de biotransformation. De manière intéressante, l'enzyme CYP3A4 est plus exprimée chez la femme que chez l'homme (162), et est responsable d'environ 50% du métabolisme des médicaments couramment prescrits (163). L'induction des CYP450 augmente la clairance de certains xénobiotiques, ce qui participe à la diminution du temps d'exposition à ces substances et à leur élimination. Mais parfois les métabolites produits lors de la phase I sont plus toxiques que les molécules parents. C'est notamment le cas du dichlorodiphényldichloroéthylène (DDE), métabolite du DDT impliqué dans le déclin de plusieurs espèces d'oiseaux. L'inhibition des enzymes de phase I par des composés endogènes ou exogènes peut également provoquer une toxicité par diminution de la capacité de l'enzyme à éliminer le xénobiotique.

4.1.3 Les enzymes de phase II

Au cours de la phase II, les métabolites issus de la phase I sont conjugués de manière enzymatique à un composé endogène hydrophile à l'aide d'enzymes appelées transférases. Les enzymes de phase II les plus courantes sont les UDP-glucuronosyltransférases (UGT), les sulfotransférases (SULT), les N-acétyltransférases (NAT), les glutathion S-transférases (GST), la thiopurine S-méthyltransférases (TPMT) et les catéchol-O-méthyltransférases (COMT). La glucuronidation est la principale réaction enzymatique de phase II pour 40% à 70% des composés endogènes et exogènes humains (164). Jusqu'à présent, 4 familles d'UGT chez l'homme ont été identifiées : UGT1, UGT2, UGT3 et UGT8. Les UGT métabolisent une large gamme de composés et leurs substrats se chevauchent également. Sur la base des connaissances actuelles, l'UGT1A1 est l'enzyme de phase II la plus exprimée chez l'homme.

4.1.4 Le transport et l'élimination des xénobiotiques

La dernière étape (phase III) correspond à l'exportation des composés hors de la cellule par des protéines transmembranaires classées en 2 superfamilles principales : les *ATP-Binding Cassette* (ABC) et les transporteurs de soluté (SLC). Les transporteurs ABC sont des protéines transmembranaires capables d'utiliser l'énergie chimique produite par l'hydrolyse de l'ATP pour faire passer activement les molécules au travers de la bicouche lipidique présente sur la membrane plasmique; alors que les SLC facilitent le passage de certains solutés (par exemple, les sucres et les acides aminés) à travers la membrane, ou transportent activement d'autres solutés contre leurs gradients électrochimiques en couplant le processus à un autre soluté ou ion. Dans le foie, les principaux transporteurs d'efflux sont la protéine de résistance aux médicaments multiples 1 (MDR1) également appelée P-glycoprotéine (P-gp), la pompe d'exportation des sels biliaires (BSEP) et la protéine associée à la multirésistance aux médicaments 2 (MRP2).

Les étapes du métabolisme des xénobiotiques, avec les récepteurs nucléaires et les enzymes de phase I, II et III sont résumées dans la **Figure 40**.

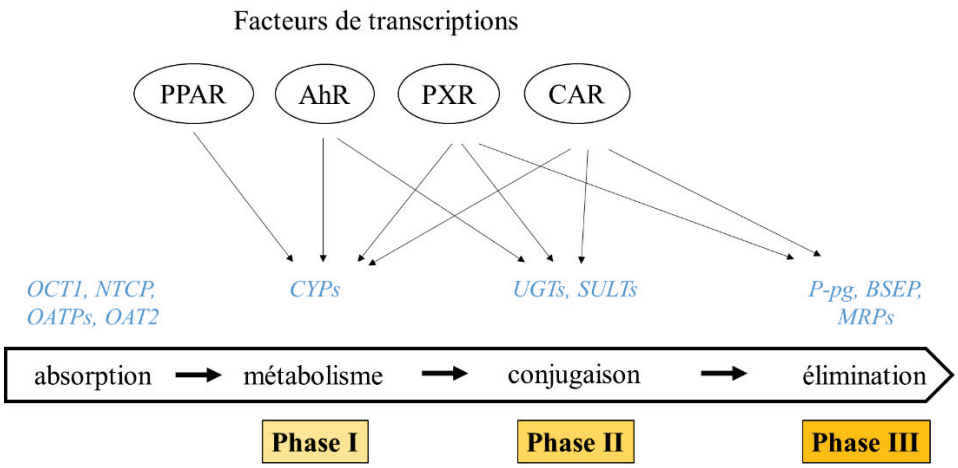


Figure 40 : **Synthèse des différentes étapes du métabolisme des xénobiotiques dans le foie**. BSEP : Bile Salt Export Pump, CYPs : cytochromes P450, MRPs : multidrug resistance protein, NTCP : Na+-taurocholate cotransporting polypeptide, OAT2 : organic anion transporters 2, OATPs : organic-anion-transporting polypeptide, OCT1 : Organic cation transporter 1, P-pg : P-glycoprotein, SULTs : sulfotransferases, UGTs : UDP-glucuronosyltransferase.

4.2 Régulation du métabolisme énergétique par les récepteurs nucléaires

Un total de 48 récepteurs nucléaires (NR) répartis en 7 sous-familles (NR0 à NR6) ont été identifiés chez l'Homme. En plus des récepteurs aux œstrogènes déjà décrits dans cette thèse, un grand nombre de NR sont impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique et notamment AhR, PXR, CAR et PPARγ, comme le témoigne le phénotype des souris présentant soit une invalidation, soit une activation du récepteur (**Figure 41**).

Nom	Modèles d'obésité	Phénotype des souris invalidées pour le gène (sauf CAR)	Mâles	Femelles	références
AhR	**Alimentation hyperlipidique**	Résistance à la prise de poids, à la stéatose hépatique, à l'insulino-résistance et à l'inflammation	X		(265)
CAR	**Alimentation hyperlipidique**	Après activation du récepteur par agoniste, observation d'une résistance à la prise de poids avec amélioration des paramètres métaboliques (sensibilité à l'insuline et tolérance au glucose), inhibition de la lipogenèse de novo et de la néoglucogenèse.	X	X	(266)
PXR	**Alimentation hyperlipidique**	Résistance à la prise de poids, à la stéatose hépatique, à l'inflammation chronique dans le tissu adipeux et amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline	X	X	(267)
PPARγ	**Alimentation hyperlipidique**	L'invalidation spécifique de PPARγ dans le tissu adipeux entraine une résistance à la prise de poids, une augmentation de la dépense énergétique, une diminution des taux sériques de leptine et d'adiponectine et empêche le développement d'une intolérance au glucose et d'une insulino-résistance.	X	X	(268)

Figure 41 : Tableau non exhaustif du phénotype métabolique des souris génétiquement modifiées pour les récepteurs aux xénobiotiques sauf pour CAR (adapté de Le Maguresse-Battistoni B., 2018 (94)).

Le tableau, ci-après, recense les NR pour lesquels une interaction avec des xénobiotiques a pu être mise en évidence. (**Figure 42**).

Classes	Nomenclature	Récepteurs nucléaires	Abréviations	Ligands naturels	Xénobiotiques
Récepteurs aux hromones stéroïdes	NR3A1/A2	Estrogen receptor	ER	Estrogènes	DES, BPA, octylphénol, retardateurs de flammes bromés (PBDE)
	NR3C4	Androgen receptor	AR	Testostérone	BPA
	NR3C3	Progesterone receptor	PR	Progestérone	BPA
	NR3C1	Glucocorticoid receptor	GR	Cortisol	BPA, phtalates
	NR3C2	Mineralocorticoid receptor	MR	Aldostérone	?
Récepteurs aux hormones thyroïdiennes	NR1A1/A2	Thyroid hormone receptor	TR	Hormones thyroïdiennes	BPA, retardateurs de flammes
Récepteurs aux xénobiotiques	NR1H2/H3	Liver X receptor	LXR	Oxystérol	?
	NR1C3	Peroxisome proliferator-activated receptor γ	PPARγ	Acides gras	Phtalates, BPA, organotins (TBT)
	NR1C1	Peroxisome proliferator-activated	PPARα	Acides gras	Phtalates, insecticides
	NR1H4/H5	Farnesoid X receptor	FXR	Acides biliaires	Pyréthrinoides
	NR2B2/B3	Retinoid X receptor	RXR	Acide rétinoïque	TBT
	NR1I2	Pregnane X receptor	PXR	Acides biliaires	Phtalates, BPA
	NR1I3	Constitutive androstane receptor	CAR	Acides biliaires	Phtalates, BPA
Récepteurs orphelins	NR3B1/B2/B3	Estrogen related receptor	EER	-	DES, BPA, 4-nonylphénol, DEHP, SERM
	NR0B2	Short heterodimeric partner	SHP	-	?
		Aryl hydrocarbon receptor	AhR	-	Dioxines (TCDD), PCB

Figure 42 : Principaux récepteurs nucléaires, leurs ligands et les éventuels polluants capables d'interaction dans la régulation du métabolisme énergétique (adapté de Weikum ER., 2018 (165))

Ceci signifie que l'activation inappropriée de ces récepteurs, par des xénobiotiques, peut conduire à des modifications métaboliques.

4.3 Données de la littérature sur les effets métaboliques des PE

La communauté scientifique parle de molécules obésogènes (166) et diabétogènes pour désigner les effets métaboliques des PE. Une molécule est dite obésogène lorsqu'elle favorise la prise de poids directement par augmentation du nombre (hyperplasie) et de la taille (hypertrophie) des adipocytes, ou indirectement en altérant les mécanismes par lesquels l'organisme régule la faim et la satiété, le métabolisme basal et la balance énergétique en favorisant le stockage de calories. L'effet diabétogène quant à lui passerait par un défaut de la sécrétion de l'insuline par les cellules bêta pancréatiques et/ou d'une résistance des tissus à l'insuline.

Un certain nombre d'études présentées ci-après apportent des éléments épidémiologiques et expérimentaux convaincants sur l'impact métabolique des PE, même si une partie d'entre-elles sont contradictoires.

4.3.1 Les études épidémiologiques

<u>Les expositions professionnelles/accidentelles</u>

Les premières évidences des effets des PE sur la santé proviennent de l'exposition professionnelle et des accidents industriels. Ces 2 types d'exposition ont en commun le caractère potentiellement toxique des polluants lié à leur exposition à des doses largement supérieures à celles rencontrées dans notre environnement, ainsi que de leur potentielle persistance dans les sols des années après leur utilisation.

- En 1976, l'explosion d'une usine de produits chimiques à Seveso en Italie a été responsable d'une libération massive de dioxines. Une étude de suivi a montré que 20 ans après cette catastrophe environnementale, les individus vivant dans les zones les plus exposées, et plus particulièrement les femmes, présentaient une augmentation du risque de développer un diabète (167). En revanche, une autre étude de suivi en 2008 reconduite sur des femmes appartenant à la cohorte Seveso Women's Health Study (SWHS), c'est-à-dire des femmes ayant entre 0 et 40 ans et vivant dans les régions les plus contaminées, n'a pas montré de lien entre l'augmentation des niveaux de TCDD dans leur sang et l'apparition d'un diabète ou d'une obésité. En revanche, l'exposition à la dioxine a été associée à une augmentation de la prévalence du syndrome métabolique, mais seulement chez les filles ayant 12 ans ou moins au moment de l'explosion (168).

- Pendant la guerre du Vietnam (1960), les forces militaires américaines ont utilisé l'agent orange (mélange de dioxines dont la TCDD) comme herbicide défoliant afin d'empêcher les soldats vietnamiens de se cacher dans les forêts et pour détruire les récoltes lors de l'opération Ranch Hand. Une étude longitudinale sur les vétérans américains exposés à cet herbicide a révélé une association entre les niveaux plasmatiques de TCDD et la prévalence du DT2 (169).
- L'incidence du DT2 a également augmenté chez les femmes lors de la catastrophe de Yucheng à Taïwan, en 1979, suite à la contamination d'huile de son de riz par un mélange de PCB, dioxines et furanes (odd ratio [OR] = 2,1. [95% IC : 1,1-4,5]) (170).

Si ces études permettent de relier le produit et la maladie, elles présentent leurs limites. Tout d'abord l'exposition, ayant lieu plusieurs années avant les analyses, est estimée le plus souvent par questionnaires ou calculs des concentrations urinaires et sériques réalisés bien plus tard. Chaque polluant ayant une demi-vie différente, il est difficile d'estimer la contamination à l'époque de l'évènement. De plus, ces études se concentrent surtout sur l'exposition à un seul PE à la fois, alors que les travailleurs sont exposés à un mélange de substances à plus ou moins fortes doses. Les résultats pourraient donc être biaisés par l'exposition, même faible, à d'autres produits du mélange.

Les études transversales

Une étude transversale est une étude descriptive dont le principe est de recueillir des observations sur un échantillon représentatif de la population cible, à un instant donné, dans le temps. Les études épidémiologiques employées sur la population générale proviennent quasiment toutes de l'US National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), base de données sur la consommation alimentaire des américains mise en place en 1960 afin d'évaluer l'état de santé et l'état nutritionnel des adultes et enfants des Etats-Unis. Depuis 1999, ce programme inclut des tests du sang et des urines pour un grand nombre de polluants. Les analyses de ces tests ont révélé non seulement que la plupart des participants avaient des niveaux détectables dans ces 2 matrices de plusieurs polluants (dont le BPA), mais aussi que le diabète sucré était fortement associé avec l'exposition aux POP, aux phtalates et au BPA (OR = 2,74. [95% IC : 1,44-5,23]) après ajustement de l'âge, du genre, de l'IMC et de l'ethnie (171,172). Lee *et al.* ont montré que l'association entre DT2 et PE est plus forte avec le DDE (métabolite actif du DDT) et le PCB153 qui ne présentent pas d'activité dioxine-like, qu'avec les polychlorodibenzo-p-dioxines (PCDD) capables d'interagir avec AhR (récepteur à la

dioxine). L'interaction POP/DT2 est plus forte chez les individus obèses, suggérant que les POP accumulés dans le tissu adipeux peuvent jouer un rôle clé dans le développement du DT2 (171,173). D'autres études ont également montré une association positive entre DT2 et POP plus forte lorsque l'IMC augmente, en lien avec les résultats présentés par la base de données NHANES (174,175).

Les études prospectives, longitudinales

Les études longitudinales s'intéressent au suivi des populations à partir d'un point de départ. Par exemple, l'équipe de Qi Sun s'est intéressée, en 2014, à l'association entre exposition au BPA et aux phtalates et le DT2 (176). Pour cela, ils ont mesuré, chez 971 femmes diagnostiquées avec un DT2 et issues des cohortes Nurse Health Study (NHS) et NHSII, les concentrations de BPA et de 8 métabolites de phtalates dans les urines, collectées 5 à 10 ans auparavant. Après ajustement de l'IMC, une corrélation positive entre les taux urinaires de BPA et butyl-phtalates et l'incidence du DT2 a été montrée dans cette étude prospective cas/témoin chez les femmes préménopausées (NHSII) mais pas chez les femmes plus âgées (NHS). Cependant, il existe de larges fluctuations au cours de la journée, chez un même individu, des concentrations urinaires ou sériques de BPA, et il est donc impossible d'établir une association entre BPA et maladies métaboliques sur la base d'un dosage unique (138). Contrairement aux liquides biologiques, la concentration de produits chimiques détectée dans les cheveux correspond au niveau moyen d'exposition d'un individu, qui représente une information plus pertinente pour l'étude des liens possibles avec des effets biologiques. Des travaux récents chez les rates ont montré un lien entre l'intensité de l'exposition et la concentration de pesticides dans les poils (177).

Une autre étude cas/témoin canadienne a comparé des femmes obèses ménopausées (178). A âge, IMC et masse grasse équivalents, les femmes obèses métaboliquement saines (30-40% des patients obèses) développent moins de tissu adipeux viscéral, présentent une meilleure sensibilité à l'insuline et un profil cardio-métabolique plus favorable que les femmes obèses avec troubles métaboliques. L'obésité métaboliquement saine est associée avec des niveaux plasmatiques plus faibles de POP. Cette étude suggère donc une association entre les niveaux plasmatique des POP et l'obésité viscérale, la résistance à l'insuline et le DT2 (178).

4.3.2 Les études expérimentales

Un grand nombre d'études expérimentales causales sont venues appuyer les évidences épidémiologiques et proposer des mécanismes d'action. Quelques exemples sont décrits ci-dessous.

Etudes sur les POP

L'étude princeps attestant une causalité entre une exposition aux POP et le développement de l'insulino-résistance et de désordres métaboliques a été réalisée par l'équipe de Ruzzin *et al.* en collaboration avec le laboratoire CarMeN. Dans cette étude, une supplémentation en huile de poisson crue dans l'alimentation entrainait chez les rats mâles une insulino-résistance, une obésité viscérale et une stéatose hépatique, mais rien n'était observé si l'huile de poisson était raffinée (179). Par ailleurs, le traitement d'adipocytes différenciés 3T3-L1 pendant 48h par des faibles doses de POP en mélange (en particulier les pesticides organochlorés et les DDT) comme celles retrouvées dans l'huile de poisson crue a induit une inhibition de l'absorption périphérique du glucose dépendante de l'insuline par baisse de GLUT4. Plus tard, ce même groupe démontre dans un modèle de souris que la consommation de saumon d'élevage (dont le régime alimentaire comporte de l'huile de poissons crue contenant des POP) avec une nourriture riche en graisses exacerbe l'insulino-résistance, l'intolérance au glucose et l'obésité viscérale (180). De plus la capacité de l'insuline à phosphoryler Akt et permettre l'absorption du glucose dans le muscle est réduite par la consommation de saumon. Lorsque le saumon contient 2 fois moins de POP, les souris accumulent moins de POP, ont moins d'obésité viscérale et ont une meilleure sensibilité à l'insuline et tolérance au glucose que celles consommant du saumon riche en POP (180).

Etudes sur le Tributylétain

Le Tributylétain (TBT), utilisé comme pesticide et revêtement antifouling dans les peintures pour les coques de bateau, est à l'origine du concept de polluants obésogènes par l'équipe de Grün et Blumberg (166). Les différentes études menées par ce groupe ont permis de montrer que le TBT est capable de se lier à PPARγ et à RXR et d'activer chacun d'eux, ce qui entraine une augmentation du nombre d'adipocytes différenciés dans un modèle de cellules 3T3-L1. De plus, chez la souris, une exposition unique en période prénatale entraine chez la descendance une modification de la programmation des cellules souches mésenchymateuses en faveur de la voie adipocytaire, au détriment de la voie des ostéoblastes

(181). Par ailleurs, l'exposition durant la puberté est associée à un gain de poids, une résistance à l'insuline, une élévation du niveau plasmatique de leptine et une stéatose hépatique chez les souris mâles (182). Le TBT reste le seul obésogène pour lequel un mécanisme d'action a été clairement identifié à ce jour.

Etudes sur le BPA

Le BPA est suspecté d'être un perturbateur métabolique, favorisant le développement des épidémies d'obésité et de DT2 (183,184). En effet, un certain nombre d'études chez le rongeur ont montré que l'exposition au BPA *in utero* et pendant la lactation augmentait de manière significative le poids corporel, la masse grasse, les lipides circulants et l'expression de gènes associés à l'adipogénèse et la lipogénèse chez les femelles (185–188). De plus, une exposition péri-pubertaire augmente également l'insulino-résistance et l'inflammation chez les femelles qui perdurent à l'âge adulte. Ceci suggère que les femelles sont plus sensibles aux effets délétères du BPA pendant ces périodes de vulnérabilité.

Les effets métaboliques du BPA sont imputables à ses propriétés de PE sur la base de l'identification (1) d'effets néfastes sur la santé, (2) d'un mode d'action endocrinien, (3) d'un lien plausible entre les effets indésirables et le mode d'action endocrinien et (4) de la pertinence pour l'homme (138). Par exemple, les effets diabétogènes du BPA seraient liés à la modification de la synthèse et / ou de la libération d'insuline par les cellules β-pancréatiques et à l'altération de la signalisation de l'insuline au niveau des organes sensibles à l'insuline (foie, muscles, tissus adipeux) (184). Précisément, le groupe de Nadal a observé que des souris femelles adultes exposées au BPA présentaient une forte intolérance au glucose, une sensibilité à l'insuline altérée ainsi qu'une augmentation du poids corporel par rapport à des souris non exposées (189). Ces auteurs ont décrit une réduction de la masse des cellules β du pancréas suite à une diminution de la prolifération et d'une apoptose accrue, conduisant à une baisse de la sécrétion d'insuline. Le BPA pourrait aussi induire une insulino-résistance d'origine musculaire. Dans leur étude, Moon *et al.* ont observé que l'exposition orale, à long terme, au BPA et à un régime gras a provoqué une intolérance au glucose et une diminution de la phosphorylation d'Akt et de GSK3β, indiquant une réponse plus faible à l'insuline et donc une résistance à l'insuline dans le muscle (190).

Cependant, il existe une importante controverse sur l'effet obésogène du BPA en raison de la divergence des résultats obtenus dans les études menées chez l'animal (191), rapportant également une baisse (192) ou aucun changement (193) du poids corporel. En raison de ces

divergences de résultats, des chercheurs ont analysé, de façon fine, les différences dans les protocoles expérimentaux. Par exemple, selon les articles, l'espèce et la souche utilisée, le stade de développement au moment de l'exposition au BPA, les âges auxquels les animaux ont été examinés, ainsi que les doses testées, les voies d'exposition et l'environnement peuvent être différents. Par ailleurs, des résultats contradictoires entre recherche académique et industrielle ont été observés (194). D'un côté, les études réalisées par des chercheurs universitaires montrent des effets à faible doses de BPA alors que les études industrielles financées par l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) ne montrent des effets toxiques qu'à forte doses. Ceci a conduit la FDA à déclarer le BPA comme étant « sans danger », tout en ignorant les effets à faibles doses et les relations dose-réponse non monotones.

Etudes sur les phtalates

Une action obésogène des phtalates a été rapportée lorsque la période d'exposition englobe la gestation et la lactation. Ainsi, les travaux de Hao *et al.* ont montré qu'une exposition périnatale au DEHP chez la souris augmentait le poids corporel et le poids du tissu adipeux de la descendance mâle et femelle 60 jours après la naissance (195). Ces évènements étaient accompagnés d'une augmentation de l'expression des facteurs de transcription PPARγ, C / EBP alpha (*CEBPα*) et Srebf1, ainsi que de certains de leurs gènes cibles (*Fabp4*, *Lpl*, *Fasn*) nécessaires à l'adipogenèse *in vivo*. Un retard de croissance chez les mâles exposés au DEHP *in utero* a été également rapporté (196). Le poids était ensuite récupéré au moment du sevrage pour même dépasser 97 jours après la naissance celui des mâles non exposés. Plus précisément, les auteurs montrent que l'exposition au DEHP a entrainé une hypertrophie des adipocytes associée à une augmentation de l'expression de gènes de l'adipogénèse (*Pparg1*, *Fabp4* et *Fasn*), causant une intolérance au glucose lorsque les mâles sont en plus nourris avec un régime gras.

In vitro, le traitement de préadipocytes 3T3-L1 par des doses faibles et croissantes (0,01 à 25 µM) de DiDP et DiNP induit l'accumulation de lipides et active l'expression de marqueurs de l'adipogenèse comme *Cebpβ* et *Pparg2* (197).

Ce sont les métabolites du DEHP qui sont responsables des effets indésirables. En effet, l'exposition de préadipocytes 3T3-L1 de souris au MEHP et au monobenzyl-phtalate (MBzP) entraine l'activation de PPARγ et une induction de la différenciation des adipocytes, ce qui n'est pas le cas avec le DEHP (198). *In vivo*, le MEHP augmente de manière significative le

poids corporel et la masse grasse viscérale des souris mâles exposées *in utero* et pendant la lactation, ainsi que les lipides et le glucose sanguins (199).

Selon Moody *et al.*, l'exposition périnatale à un mélange de six phtalates (DEP, DEHP, DnBP, DiNP, DiBP et BBzP) augmente la taille des adipocytes et l'expression du gène *Frizzled-1* (*Fzd1)* - marqueur de l'adipogénèse - chez les femelles (200). Les auteurs proposent que l'effet adipogénique pourrait s'expliquer par des différences de méthylation au niveau des sites d'initiation de la transcription présents sur les gènes cibles dont *Fzd1*.

Même si les mécanismes d'action à l'origine des perturbations métaboliques observées chez l'animal ne sont pas encore bien compris, il semblerait qu'une grande partie des effets des phtalates soit probablement liée à leur fixation sur les récepteurs nucléaires et en particulier PPARγ (201–203). Cependant, tous les phtalates ne semblent pas interagir avec PPARγ. Dans une étude de docking s'intéressant à la fixation du DEHP et de deux de ses métabolites (MEHP et MEOHP) sur PPARγ, Kratochvil *et al.* ont observé que seulement les métabolites sont capables de se fixer dans la poche de liaison au ligand de ce récepteur, modulant ainsi le métabolisme des lipides (204). Ceci pourrait expliquer pourquoi les métabolites seraient plus actifs que les molécules parents.

Etudes sur les mélanges

Même si le nombre d'études sur les effets des PE est important, peu d'études en revanche s'intéressent à l'impact métabolique des mélanges de polluants environnementaux. Afin de mieux comprendre les effets cocktails des PE, le laboratoire a développé un modèle d'exposition chronique chez la souris à un mélange de 4 polluants, incluant 2 polluants persistants (TCDD et PCB153) et 2 non persistants (BPA et DEHP), introduits dans une alimentation riche en gras et en saccharose, à des doses proches de la DJT. Ces polluants sont notamment connus pour être présents dans l'alimentation de type occidentale et suspectés d'être impliqués dans l'étiologie des maladies métaboliques (120,183,205–207). De manière intéressante les résultats ont montré que les souris femelles exposées *in utero* au mélange de PE présentaient une aggravation de l'intolérance au glucose et de la résistance hépatique à l'insuline à l'âge adulte, phénomènes non rapportés chez la descendance mâle (208). De plus les souris femelles exposées au même cocktail de polluants, mais dans une alimentation standard ont une augmentation du contenu hépatique en triglycérides et une insulino-résistance (209). En plus de dépendre du sexe et du contexte nutritionnel, les effets dépendraient de l'âge puisqu'en comparaison des femelles adultes âgées de 12 semaines, les

femelles âgées de 7 semaines présentent une amélioration de la tolérance au glucose, du rapport masse maigre/masse grasse, de la sensibilité musculaire à l'insuline ainsi qu'une diminution de l'expression des marqueurs de l'inflammation dans le tissu adipeux sous-cutané (210).

D'autres études sur des mélanges de polluants, à faibles doses, ont été testées chez la souris et le rat, et ont également rapporté des altérations significatives de l'expression des gènes hépatiques, en accord avec le fait que le foie soit le site primaire de détoxification. On notera, par exemple, l'étude de Lin *et al.* sur des souris exposées pendant 12 jours à un mélange composé d'un phtalate (DEHP) et de PCB. Ici, les auteurs ont observé une augmentation de la masse du foie sans modification du poids corporel, associée à une augmentation de l'expression hépatique de PPARγ dans les deux sexes et une diminution de l'expression d'ERα seulement chez les femelles (211). Ceci souligne bien la nécessité de considérer le sexe comme une variable biologique (57). Un dimorphisme sexuel a également été constaté à la suite de l'exposition à un mélange de 4 fongicides et 2 insecticides dans une alimentation standard chez des souris mâles et femelles âgées de 16 semaines (212). D'un côté, les mâles exposés présentaient une augmentation du poids corporel et de la masse grasse associée à une stéatose hépatique, une hyperglycémie à jeun et une forte intolérance au glucose. De l'autre, les femelles ne présentaient qu'une hyperglycémie à jeun, et une légère intolérance au glucose.

En accord avec les données du laboratoire (208,209), d'autres études ont montré que l'état nutritionnel était aussi une variable à considérer. Par exemple, l'exposition à un mélange de PCB et de pesticides organochlorés, à des doses environnementales, chez des souris ob/ob favorise la stéatose hépatique, tout en diminuant l'hypertriglycéridémie, ce qui met en évidence que l'exposition à un mélange défini de POP modifie le métabolisme systémique des lipides dans un modèle génétiquement induit d'obésité et de DT2 (213).

Il a également été montré que l'exposition à un mélange de POP aggrave la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) chez les souris déficientes en apolipoprotéine E ($ApoE^{-/-}$). Dans cette étude, Shan *et al.* ont exposé ces souris à la dioxine TCDD, à l'Aroclor 1254 (mixture de PCB) ou à la combinaison des deux pendant 6 semaines. En comparaison des expositions individuelles, la co-exposition TCDD/PCB aggrave la stéatose hépatique, la nécrose et l'inflammation chez les souris $ApoE^{-/-}$ (214). Cependant dans cette étude, les effets

hépatotoxiques des polluants s'observent à des doses largement supérieures à leur DJT. Ici, la TCDD est dosée à 15 µg/kg/j alors que sa DJT est de 4 pg/kg/j.

Objectifs

Il ne fait plus aucun doute que l'épidémie des maladies métaboliques ne peut être expliquée complètement par l'excès de calories ingérées, la sédentarité, le déficit de sommeil ou encore le vieillissement. Parmi les facteurs environnementaux impliqués dans la santé métabolique, l'exposition aux perturbateurs endocriniens (PE) constitue un facteur étiologique plausible. Exerçant des effets délétères envers plusieurs tissus métaboliquement actifs, ces produits chimiques engendrent l'apparition de maladies métaboliques dont les manifestations cliniques vont de l'obésité au syndrome métabolique, en passant par le diabète et la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) (215). Même si la littérature sur le sujet apporte de plus en plus de preuves sur la réalité des effets néfastes des polluants environnementaux, la plupart des études n'ont testé que l'exposition à une seule substance. Or, nous sommes quotidiennement exposés dans notre environnement à une myriade de composés chimiques dont les quantités sont infimes, que ce soit par l'eau que nous buvons, l'air que nous respirons ou encore la nourriture que nous mangeons. Une partie non négligeable de ces polluants est retrouvée dans notre alimentation, aussi bien dans les emballages alimentaires (BPA, phtalates) que dans la nourriture elle-même, et plus particulièrement dans les produits riches en matières grasses qui contiennent des polluants aux propriétés lipophiles (les POP), capables de s'accumuler dans le tissu adipeux.

En mélange, les polluants environnementaux peuvent perturber l'homéostasie énergétique à des concentrations qui, prises individuellement, n'entrainent pas d'effets indésirables. Au laboratoire, notre équipe étudie l'impact de l'exposition à une mixture de polluants présents dans notre environnement alimentaire sur le poids corporel, la masse grasse, les paramètres biologiques, la stéatose hépatique, la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline de souris exposées *in utero* puis lors du sevrage.

De manière intéressante, l'exposition aux polluants aggrave l'intolérance au glucose et la résistance hépatique à l'insuline, sans prise de poids supplémentaire à celle induite par le régime gras-sucré, seulement chez les femelles adultes âgées de 12 semaines (208). Par rapport aux souris obèses non exposées, ces mêmes femelles présentent une réduction de l'expression d'ERα et de ses gènes cibles, ainsi qu'une induction de l'expression d'EST qui inactive les œstrogènes, traduisant une perturbation de la signalisation hépatique à l'insuline.

Inversement, l'exposition aux polluants chez des souris plus jeunes (7 semaines) réduit l'intolérance au glucose, la masse grasse et l'expression de marqueurs de l'inflammation du tissu adipeux, et s'accompagne d'une augmentation de la sensibilité musculaire à l'insuline (210).

L'une des raisons permettant d'expliquer cet effet, en deux temps, sur le métabolisme énergétique en fonction de l'âge, pourrait être liée au contexte hormonal. En effet, on sait que les œstrogènes protègent des complications métaboliques de l'obésité et du diabète lorsqu'ils sont présents à des doses physiologiques. En dehors de cette gamme optimale, les œstrogènes peuvent avoir des effets négatifs. Par ailleurs, certains polluants du mélange (comme le BPA et le PCB153) ont des propriétés œstrogéno-mimétiques. Cela pourrait expliquer que chez les souris immatures de 7 semaines, les effets œstrogéno-mimétiques des polluants améliorent le phénotype métabolique (**Figure 1**, zone verte). A l'inverse chez les souris adultes âgées de 12 semaines, lorsque les niveaux circulants d'œstrogènes sont au plus haut, les polluants pourraient aggraver l'intolérance au glucose *via* l'induction de l'EST, réduisant la signalisation œstrogénique (**Figure 1**, zone rouge).

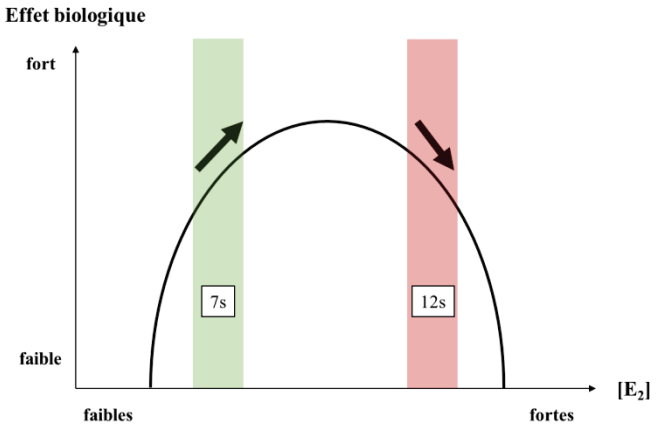


Figure 13 : **Courbe théorique de la réponse biologique aux œstrogènes en fonction de leurs concentrations plasmatiques**. 7s et 12s correspondent respectivement à 7 semaines et 12 semaines de vie chez la souris (d'après Naville D., 2013 ; 2015 (208,210)).

En extrapolant cette hypothèse expérimentale à l'humain, on pourrait supposer que dans des conditions de déficiences en œstrogènes comme la ménopause, l'exposition à des substances chimiques environnementales aux propriétés œstrogéniques (xénoœstrogènes) pourrait impacter les risques cardiovasculaires et métaboliques qui peuvent apparaitre durant cette période.

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier cette hypothèse expérimentalement. L'ovariectomie étant le modèle d'étude qui a créé le plus de connaissances à ce jour sur le rôle des hormones ovariennes dans les différents organes du corps humain, nous avons donc utilisé un modèle d'ovariectomie combinée à une alimentation obésogène chez la souris afin de mimer le statut hormonal d'une femme après la ménopause et les complications métaboliques qui l'accompagnent (dyslipidémie, insulino-résistance, stéatose hépatique, etc.). Parallèlement, ces souris ont été ou non exposées au mélange de polluants décrit précédemment. Les travaux concernant cette première étude ont fait l'objet d'un article publié dans le journal *Environmental Toxicology and Pharmacology* (**article 1**).

Le second objectif de ce travail de thèse a été de caractériser, de manière plus complète, les effets métaboliques associés à la déficience en œstrogènes et à l'exposition aux polluants environnementaux aux propriétés œstrogéno-mimétiques. Pour cela, nous avons repris le protocole expérimental de l'**article 1**. Cependant, deux changements majeurs ont été effectués :

- Le premier a consisté en l'administration d'un traitement hormonal à base d'œstradiol (E2) afin de vérifier si les effets observés en condition d'ovariectomie étaient principalement dus au défaut d'œstrogènes.
- Le second a été d'exposer directement des souris âgées de 5 semaines aux polluants, sans passer par une exposition pendant la période de développement périnatale (gestation, lactation). L'intérêt de cette démarche a été de pouvoir comparer les résultats obtenus avec ceux de l'étude précédente afin de vérifier si l'exposition aux polluants, durant la vie fœtale, joue un rôle dans l'homéostasie glucido-lipidique à l'âge adulte.

Résultats

1 Article 1

Arguments en faveur d'effets œstrogéno-mimétiques d'un mélange de polluants faiblement dosés dans un modèle de souris ovariectomisées.

Article 1

Environmental Toxicology and Pharmacology, 2017

Evidence for estrogeno-mimetic effects of a mixture of low-dose pollutants in a model of ovariectomized mice

Julien B., Pinteur C.[1], Vega N.[1], Labaronne E., Vidal H., Naville D.[2], Le Magueresse-Battistoni B[2]

[1] These authors contributed equally.

[2] These authors share the last authorship.

Résumé

Des preuves convaincantes ont démontré que les polluants environnementaux contribuent à l'étiologie de l'obésité et des maladies métaboliques associées dont le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires. Récemment, nous avons émis l'hypothèse qu'un mélange de polluants persistants (dioxine, PCB) et non persistants (BPA, phtalates), à faibles doses, fréquemment retrouvés dans l'alimentation pourrait avoir des propriétés œstrogéno-mimétiques dans un modèle de souris femelles exposées tout au long de la vie. Dans cette étude, nous avons évalué l'impact métabolique de ce mélange dans des conditions de déficience en œstrogènes. Nous avons estimé que si l'hypothèse était toujours vraie, le mélange de polluants devrait atténuer les effets métaboliques délétères induits par l'ovariectomie.

Toutes les procédures ont été effectuées avec l'approbation du comité régional d'éthique pour l'expérimentation animale. Des souris femelles C57BL/6J ont été exposées de la préconception jusqu'à l'âge adulte à une alimentation riche en lipides et en saccharose (HFSD) contenant (HFp) ou non (HF0) un mélange de polluants (2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine [TCDD], polychlorobiphényle 153 [PCB153], bisphénol A [BPA] et phtalate de diéthylhexyle [DEHP]), chacun étant utilisé à une dose proche de sa dose journalière tolérable. A l'âge de 5 semaines, les souris ont subi une ovariectomie (OVX) ou ont été opérées mais non ovariectomisées (sham), générant un total de 4 groupes (HF0-sham / HF0-OVX / HFp-sham / HFp-OVX). Le poids et la prise alimentaire ont été enregistrés chaque semaine. Plusieurs paramètres sanguins, la tolérance au glucose, la résistance à l'insuline ainsi que l'expression d'un certain nombre de gènes dans le tissu adipeux et le foie ont été mesurés.

Les résultats montrent que l'ovariectomie a entraîné une augmentation du poids corporel sans modification de la prise alimentaire. Les souris ayant reçu du HFSD ont présenté une intolérance au glucose et des taux d'insuline plasmatiques élevés qui se sont aggravés chez les souris OVX. L'exposition aux polluants n'a eu aucune incidence sur le poids corporel, la prise alimentaire ou les taux plasmatiques d'insuline. Cependant, il en est résulté une diminution du taux plasmatique de triglycérides (0,71 ± 0,019 mM vs 0,83 ± 0,033 mM ; p = 0,008) et une amélioration de la tolérance au glucose chez les femelles OVX. De plus, les taux d'insuline plasmatique, à jeun, mesurés au maximum de la réponse après l'injection de glucose au cours du GTT (soit 15 minutes) étaient 1,6 fois plus élevés chez les souris HFp-OVX que chez les souris HF0-OVX. Cet effet n'a pas été observé chez les souris sham. Bien que la *p*value =

0,06, cela pourrait expliquer l'atténuation de l'intolérance au glucose observée en réponse aux polluants dans les conditions OVX. En accord avec les travaux de la littérature, le protocole d'ovariectomie résulte en une augmentation significative du niveau d'ARNm de *Ccl2* ($p<0,05$) dans le tissu adipeux sous-cutané (TAsc) et viscéral (TAv), indiquant un effet inflammatoire. De manière intéressante, la hausse de l'expression de *Ccl2* dans le TAv est partiellement empêchée chez les souris OVX exposées aux polluants. De plus, chez les souris HFp-OVX, le mélange de polluants a entraîné une augmentation de 1,4 fois de l'expression du gène *Esr1* ($p = 0,038$) par rapport aux souris non exposées ayant subi l'OVX.

En accord avec notre hypothèse de travail sur l'activité œstrogéno-mimétique du mélange de polluants, nous avons observé des effets métaboliques bénéfiques du mélange de polluants dans des conditions de déficience en œstrogènes. En raison des très faibles doses de polluants utilisées dans les mélanges, ces résultats pourraient avoir de fortes implications en termes de compréhension du rôle potentiel des contaminants environnementaux dans le développement de maladies métaboliques.

Environmental Toxicology and Pharmacology 57 (2018) 34–40

Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Toxicology and Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/etap

Research Paper

Evidence for estrogeno-mimetic effects of a mixture of low-dose pollutants in a model of ovariectomized mice

Benoit Julien, Claudie Pinteur[1], Nathalie Vega[1], Emmanuel Labaronne, Hubert Vidal, Danielle Naville[2], Brigitte Le Magueresse-Battistoni[*,2]

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

ARTICLE INFO

Keywords:
Endocrine disruptors
Metabolic disorders
Ovariectomy
Estrogeno-mimetic compound

ABSTRACT

We recently hypothesized that a mixture of low-dosed dioxin, polychlorobiphenyl, phthalate and bisphenol may induce estrogeno-mimetic activities in a model of lifelong-exposed female mice. Herein, we evaluated the impact of this mixture in estrogen deficiency conditions. Based on the protective effects of estrogens against metabolic disorders, we reasoned that exposure to pollutants should attenuate the deleterious metabolic effects induced by ovariectomy. In line with the hypothesis, exposure to pollutants was found to reduce the impact of ovariectomy on glucose intolerance and insulin resistance, to enhance the expression levels of the hepatic estrogen receptor α and to attenuate the ovariectomy-induced enhancement of the chemokine MCP-1/CCL2 considered as an indicator of estrogen signalling. Because of the very low doses of pollutants used in mixture, these findings may have strong implications in terms of understanding the potential role of environmental contaminants in the development of metabolic diseases, specifically in females during menopausal transition.

1. Introduction

Convincing evidences have demonstrated that environmental pollutants contribute to the aetiology of obesity and associated metabolic disorders including diabetes and cardiovascular diseases (WHO, 2016; Casals-Casas and Desvergne, 2011; Gore et al., 2015; Lee et al., 2014). These multifactorial diseases have risen dramatically these last few decades and they constitute a true challenge for Public Health in terms of quality of life and life expectancy but also because of the heavy economic cost for the society (Trasande et al., 2016). WHO, 2016 reported a doubling of the worldwide prevalence of obesity between 1980 and 2014 so that 39% of adults were overweight in 2014 and the global prevalence of diabetes has also risen during this period of time to affect 8.5% of adults.

It has been suggested that mechanisms by which chemicals interfere with energy homeostasis could be related to their hormono-mimetic properties. An endocrine disrupting chemical (EDC) is an exogenous substance or mixture of chemicals that interfere with any aspect of hormone action (Zoeller et al., 2012). About a thousand of chemicals could display ED activities and a subset was identified as metabolic disruptors (Heindel et al., 2017; Nadal et al., 2017; Casals-Casas and Desvergne, 2011; Janesick and Blumberg, 2016). Indeed, it is well documented that energy balance is a highly controlled process depending on a multitude of hormonal inputs and signalling molecules interconnecting central and peripheral organs to meet energy demands and preserve homeostasis (Mauvais-Jarvis et al., 2013). Identified chemicals concerned dioxins which are by-products issued from industrial processes or polychlorobiphenyls (PCBs) produced for their fire-resistant characteristics. Although dioxin production is limited and PCBs forbidden, their persistent properties made them still present in the environment. Other EDCs may have short half-life (e.g., phthalates, bisphenols). However because they are massively produced by industry

Abbreviation: EDC, endocrine disrupting chemical; PCB, polychlorobiphenyl; TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; BPA, bisphenol A; ER, estrogen receptor; EST, estrogen sulfotransferase; HFHS, high-fat high-sucrose; DEHP, Di-[2-ethylhexyl]-phthalate; GTT, glucose tolerance test; TDI, tolerable daily intake; OVX, ovariectomy; FFA, free fatty acids; AT, adipose tissue; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; Ccl5, Chemokine (C-C motif) ligand 5; IL6, IL1: interleukin 6 interleukin 1; Gusb, b-glucuronidase; HPRT, hypoxanthine ribosyl transferase; TBP, TATA-Box Binding Protein; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; SREBP1, sterol response element binding protein 1; CPT1, carnitine palmitoyl transferase

* Corresponding author at: CarMeN laboratory, INSERM U1060, Faculté de Médecine Lyon-Sud, Chemin du Grand Revoyet, 69600 Oullins, France.
E-mail addresses: benoit.julien@univ-lyon1.fr (B. Julien), claudie.pinteur@univ-lyon1.fr (C. Pinteur), nathalie.vega@univ-lyon1.fr (N. Vega), emmanuel.labaronne@ens-lyon.fr (E. Labaronne), hubert.vidal@univ-lyon1.fr (H. Vidal), danielle.naville@inserm.fr (D. Naville), brigitte.lemagueresse@inserm.fr (B. Le Magueresse-Battistoni).

[1] CP and NV contributed equally.
[2] DN and BLMB share the last authorship.

https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.11.008
Received 10 November 2017; Accepted 15 November 2017
Available online 16 November 2017
1382-6689/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

for everyday plastic objects or medical equipment among others, everyone is continuously exposed as reflected by the constant detectable levels of several of them in blood, urine or hair (Casals-Casas and Desvergne, 2011; Lee et al., 2014; Appenzeller et al., 2017; Vandenberg et al., 2012). Importantly, these chemicals have been identified as bearing estrogeno-mimetic, anti-estrogenic or anti-androgenic properties which explain that EDCs were first identified as altering the reproductive function and fertility (Vandenberg et al., 2012; Zoeller et al., 2012). The challenge of EDCs resides in that they may act at low and environmental doses in a manner possibly depending on the tissue considered, the sex of the individual and the timing of exposure, all in a context of multi-exposure (Vandenberg et al., 2012; Zoeller et al., 2012; Casals-2011Casas and Desvergne, 2011; Gore et al., 2015; Le Magueresse-Battistoni et al., 2017; Heindel et al., 2017; Barouki et al., 2012).

To enhance our understanding on the metabolic impact of EDCs in mixture, we have developed in the laboratory a model of lifelong exposure to a mixture made of 4 well-spread chemicals including a dioxin (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin [TCDD]), PCB153, diethylhexylphthalate (DEHP) and bisphenol A (BPA) at doses in the range of the Tolerable Daily Intake (TDI), thus without expected adverse health effects (Dorne, 2010). Further, these pollutants could be found in a Western-type of diet and are archetypal examples of EDCs suspected to be involved in the aetiology of metabolic disturbances (Lee et al., 2014; Heindel et al., 2017; Le Magueresse-Battistoni et al., 2017; Le Magueresse-Battistoni et al., 2015; Nadal et al., 2017). Importantly, using this model we reported an aggravation of glucose intolerance and hepatic insulin resistance in adult female mice but not in the sibling males. Specifically, we found reduced expression levels of the estrogen receptor α (ERα) and induction of the estrogen sulfotransferase (EST) that inactivates estrogens, all consistent with reduced hepatic estrogen signalling (Naville et al., 2013). Conversely, in immature female mice characterized by low circulating levels of estrogens, lifelong exposure to the pollutant mixture induced improvement of glucose tolerance, enhanced lean mass, and reduced inflammation of the adipose tissue consistent with enhanced estrogen signalling (Naville et al., 2015). We therefore put forward the hypothesis that the mixture of pollutants could exert estrogeno-mimetic effects. Indeed, it is well established that estrogens protect females against metabolic disorders and diabetes for concentrations which stay within physiological range values (Mauvais-Jarvis, 2015), and that the metabolic protective effect of estrogens requires intact hepatic estrogen signalling through its receptor α (ERα) (Zhu et al., 2013). To give further insight to the hypothesis, we have evaluated in the present study the impact of the mixture of pollutants in conditions of estrogen deficiency. We reasoned that if the hypothesis still holds true, then the mixture of pollutants should attenuate the deleterious metabolic effects induced by ovariectomy.

2. Materials and methods

2.1. Animals, diets and experimental design

All procedures were performed with the approval of the Regional Committee of Ethics for Animal Experiments and the French Ministry for Higher Education and Research. After one week acclimatization, five week-old C57Bl6 female mice (Envigo, Gannat, France) were fed a high fat-high sucrose diet (HFHS) (from Envigo) containing (HFp) or not (HF0) a mixture of pollutants. The diet was given 5 weeks before mating with standard-chow adult C57Bl6 males and continued during gestation and lactation. At weaning, the offspring (F1 mice) received the same diet than their dams. By 5 weeks, half of the F1 females were ovariectomized (OVX) and the other half was sham-operated, generating 4 groups of 7–9 animals per group: HF0-OVX and HF0-sham not exposed to the pollutant mixture and HFp-OVX and HFp-sham exposed to the pollutant mixture. Surgeries were performed under anaesthesia using a mixture of ketamine (100 µg/g) and xylazine (10 µg/g) injected intraperitoneally. Ovaries were removed (OVX) or not (sham-operated) after two small flank incisions. The analgesic meloxicam was added to the water during the first days after surgery.

With this protocol, HFp dams underwent normal gestation. All parameters (litter size, sex-ratio and pup weight) were in the normal range, consistently with the previous data of the laboratory (Naville et al., 2013). Body weight and food intake were recorded weekly throughout the protocol until mice were 12-weeks of age. Validation of the surgery was assessed at the time of sacrifice with the observation of uterine atrophy in the OVX females. We also quantified 17ß estradiol levels and found them below the detection threshold of the assay (Interchim, Cayman EIA kit, Montluçon, France) both in HF0- and HFp-OVX mice.

The pollutant mixture was made of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD, CAS n° 1746-01-6), Polychlorinated biphenyl (PCB) 153 (CAS n°35065-27-1), Bisphenol A (BPA, CAS n°80-05-7) and Di-[2-ethylhexyl]-phthalate (DEHP, CAS n°117-81-7) (all from Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Each pollutant was used at a dose close to its tolerable daily intake (TDI) reference dose of either the pollutant itself (DEHP, BPA) or representative congeners (TCDD, PCB153) (EUROPEAN, 2005; EFSA Panel on Food Additives 2015, WHO, 2003; Van Leeuwen et al., 2000). Pollutants dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) were diluted in corn oil to facilitate uniform homogenization in the food. Pollutant-free diet contained volumes of DMSO and corn oil identical to the pollutant-containing food. The composition of the diets is given in the supplemental data (Supplementary Table 1). Thus, it resulted in a daily exposure to 2 pg/kg bw/d of TCDD, 80 ng/kg bw/d of PCB153, 50 µg/ kg bw/d of DEHP and 5 µg/ kg bw/d of BPA, as previously described (3). (Naville et al., 2013; Naville et al., 2015). An additional pellet of pollutant-free HFSD diet was provided to animals to ensure they were fed ad libitum.

2.2. Metabolic tests

After 16 h of fasting, mice were injected intraperitoneally with glucose 1 mg/g of body weight for the glucose tolerance test (GTT). Blood glucose was measured using OneTouchUltra glucometer (Lifescan, Issy-Les-Moulineaux, France). At times 0 and 15 min of the GTT, about 20 µl of blood was collected from tail using heparinized glass capillary tubes. Recovered plasma was used for the measurement of insulin by ELISA (Mouse Ultrasensitive ELISA, Eurobio, Courtaboeuf, France).

2.3. Blood and tissue collection

Mice were fasted six hours and blood was collected by retro-orbital sampling. Mice were euthanized by cervical dislocation and liver, gastronecmius muscle, subcutaneous and visceral (periovarian + parametrial) adipose tissue were quickly dissected and snap-frozen in nitrogen liquid. We measured blood concentration of glucose (glucometer), plasma levels of insulin (Mouse Ultrasensitive ELISA, Eurobio), free fatty acids (FFA) (Sigma-Aldrich), triglycerides (Biolabo, Maizy, France), and leptin (Crystal Chem, Zaandam, Netherlands). Triglycerides were also measured in the liver after extraction of lipids from frozen liver samples using a lipid Extraction kit chloroform-free (Clinisciences, Nanterre, France).

2.4. Real time PCR analyses

Total RNA extracted from frozen liver and adipose tissue samples was reverse-transcribed and analyzed by real-time PCR as described (Naville et al., 2011) using a set of specific primers (Supplementary Table 2). Data were normalized relatively to house-keeping genes which were Gusb (encoding b-glucuronidase) for liver, HPRT (encoding hypoxanthine ribosyl transferase) for subcutaneous adipose tissue and TBP (encoding TATA-Box Binding Protein) for visceral adipose tissue.

2.5. Western blotting analysis

Proteins prepared from liver were separated on SDS-10% polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane. Immunoblotting was performed as previously described (Naville et al., 2013). Primary antibodies included mouse monoclonal antibodies directed against Esr1 (dilution 1:1000; sc-8005; Santa-Cruz Biotechnology, Cliniscience, Nanterre, France) or α-tubulin (dilution 1:2000; T5168; Sigma-Aldrich). The secondary antibodies were anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP) conjugate (Bio-Rad, Marnes-la-coquette, France). Blots were revealed using the Luminata Classico Western HRP substrate (Millipore, Molsheim, France) and detection was made using the ChemiDocXRS + imaging system (BioRad). Results were analyzed with Image Lab Software (BioRad). Data were normalized relatively to α −tubulin.

2.6. Statistics

All results are expressed as means ± SEM and differences between means were considered significant at p-value < 0.05. The normality of each variable was assessed using the Shapiro-Wilk test. To test for statistical significance, two-way ANOVA for non-repeated measures with ovariectomy and pollutants as factors was used. When significant effects without interaction were obtained, differences were tested using Student's t-test between the pollutant-exposed group and the non-exposed group. GraphPad Prism 5.0 software was used for all statistical analysis.

3. Results and discussion

3.1. Pollutants reduced the impact of ovariectomy on glucose intolerance and insulin resistance

Estrogens confer metabolic protection to female mice especially when the animals are exposed to a diabetogenic stress such as a high-fat diet (Riant et al., 2009; Camporez et al., 2013). To examine the plausibility of the hypothesis that the mixture of pollutants exerted estrogeno-mimetic activities, we used a model of estrogen deficiency and investigated if the deleterious metabolic effects of pollutants shown in intact females (Naville et al., 2013) were alleviated in OVX mice. Of note, all females have been fed a HFHS diet and were obese, glucose intolerant and insulin resistant (Naville et al., 2013), ovariectomy resulting in a further gain weight (Fig. 1A and B) with enhanced accumulation of fat mass (Fig. 1D and E) and aggravation of glucose intolerance (Supplementary Figure), in accordance with the literature (Camporez et al., 2013). Pollutants did not alter body weight, weight gain, food intake or the weight of fat pads in either sham-operated or OVX females (Fig. 1). Finally, there were no changes in the weight of the liver or muscle between groups (data not shown).

In line with the hypothesis, we observed on the one hand, that sham-operated females exposed to pollutants consistently displayed an aggravation of glucose intolerance compared to HF0-sham (Fig. 2A). On the other hand, exposure of OVX females to pollutants resulted in an alleviation of glucose tolerance (Fig. 2B). It led to a significant inversion ($p = 0.002$) of the AUC profile between the sham and the OVX females lifelong-exposed to pollutants (Fig. 2C). Interestingly, after 16 h of fasting (time 0 of the GTT) the pollutant-exposed mice exhibited significant lower plasma insulin levels ($p = 0.047$) than the non-exposed mice but only in conditions of estrogen deficiency (Fig. 2D and E). Furthermore, in term of insulin levels, HFp-OVX females responded better than HF0-OVX females to glucose injection and insulin production was around 4-times enhanced (3.94-fold, $p < 0.01$) compared to a 2.47-fold enhancement ($p < 0.01$) in HF0-OVX females (Fig. 2E). It indicated a greater ability to produce insulin in response to glucose in HFp versus HF0 mice in conditions of estrogen deficiency. In addition, the HOMA-IR calculated at euthanasia was reduced by one third ($p = 0.051$) in HFp-OVX as compared to HF0-OVX mice (Table 1). To complete the metabolic phenotype, we observed that plasma TG levels were significantly reduced (-15%; $p = 0.008$) in HFp-OVX as compared to HF0-OVX mice (Table 1). Collectively, these data indicated benefit effects of pollutant exposure on insulin sensitivity in conditions of estrogen deficiency induced by ovariectomy.

Notwithstanding, pollutants did not mimic the effects of estrogen replacement on body weight (Fig. 1) (Camporez et al., 2013) or on uterus weight (not shown) which may indicate that the estrogeno-mimetic activity of the mixture was relatively low. Indeed, it is well demonstrated that ovariectomy results in a gain of weight and uteri atrophy, both events being corrected by estrogen replacement in rodent experimental models (Mauvais-Jarvis, 2015). In our experimental protocol, 12-week old OVX females were 9.6% lighter in the HFp group compared to the HF0 group. Nonetheless, they remained significantly heavier than HFp sham-operated mice (Table 1) and leptin levels, which were enhanced in OVX mice consistent with enhanced fat mass, were not normalized by pollutants (Table 1). As well, the ovariectomy-induced elevation of free fatty acids predictive of insulin resistance (Bergman and Ader, 2000) was not corrected by pollutant exposure

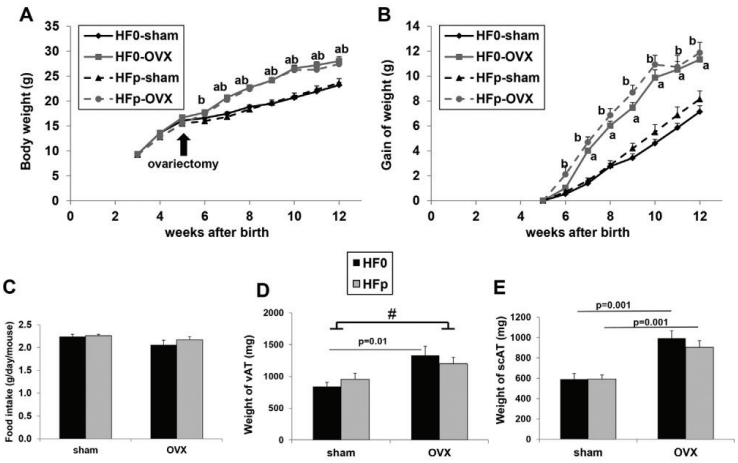


Fig. 1. Phenotype of the female mice fed HFSD (HF0-sham and HF0-OVX) or HFHS containing the mixture of pollutants (HFp-sham and HFp-OVX). A) Body weight curves before (3–5 weeks of age) and after ovariectomy. B) Cumulative gain of weight after surgery. C) Average of food intake calculated during the four last weeks of life. Weight of visceral (D) and subcutaneous adipose tissue (E). Results are means ± SE (n = 7 to 9). For A) and B), a: $p < 0.05$ HF0-OVX *vs* HF0-sham; b: $p < 0.05$ HFp-OVX *vs* HFp-sham. For D), #: significant effect of the ovariectomy operation tested by two-way ANOVA.

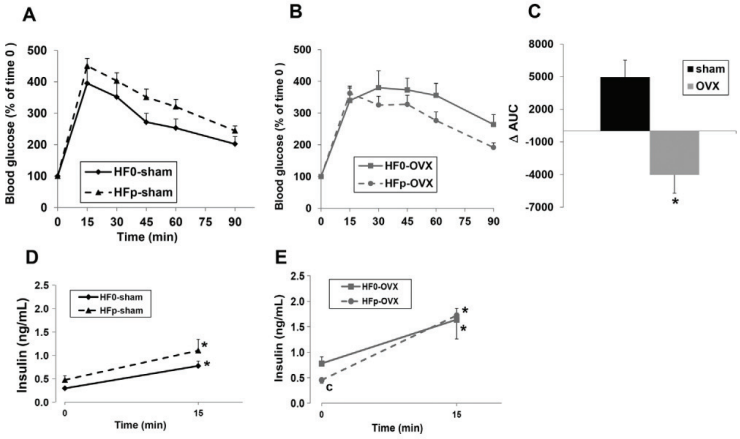


Fig. 2. Glucose tolerance tests (GTT). Blood glucose measurement during GTT for HF0-sham *vs* HFp-sham mice (A) and HF0-OVX *vs* HFp-OVX (B). C) Differential AUC (Δ AUC) between HF0 and HFp, calculated from GTT curves obtained for sham *vs* OVX mice in both groups. Plasma insulin measurement before (time 0) and 15 min after glucose injection for HFp-sham *vs* HF0-sham mice (D) and HFp-OVX *vs* HF0-OVX (E). Results are means ± SE (n = 6 to 9). * $p < 0.05$ between time 15 and corresponding time 0. **c**: $p < 0.05$ HFp-OVX vs HF0-OVX.

(Table 1). It could indicate that insulin sensitivity is extremely responsive to the estrogenic activity while normalization of FFA, body weight and leptin levels by estrogen replacement would require a much higher activity. Alternatively, it has been demonstrated that normalization of insulin sensitivity and glucose tolerance preceded body weight and adiposity rescue in mouse models of OVX after E2 replacement (Riant et al., 2009; Camporez et al., 2013). It would therefore be of interest to have a follow-up of the OVX mice during a longer period of time.

3.2. Pollutants reduced the inflammatory impact of ovariectomy on the adipose tissue

Insulin resistance triggers by a high-fat diet is accompanied by enhanced fat mass and low-grade inflammation that largely originates from the adipose tissue (AT) and AT dysfunction is considered as a key initiating factor and a main source of inflammatory signalling in obesity-related metabolic diseases illustrating the interference of inflammatory activation with metabolism (Hotamisligil, 2006). Estrogens well illustrate this interface between inflammation and metabolic disorders because they oppose the ovariectomy-induced metabolic disorders that include enhanced fat mass, insulin resistance, glucose intolerance but also enhanced inflammation (Monteiro et al., 2014; Benedusi et al., 2015). Importantly, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1 encoded by Ccl2 gene) could play a critical role in inflammation associated with metabolic dysfunction. Indeed, overexpression of MCP-1 in adipocytes triggers adipose tissue inflammation and insulin resistance (Kanda et al., 2006) whereas its deficiency has been reported to ameliorate metabolic parameters of mice fed a high-fat diet (Tateya et al., 2010). Furthermore, MCP-1 level was enhanced in conditions of estrogen deficiency during menopausal transition (Tani et al., 2013) or following ovariectomy (Kim et al., 2013) and the OVX-induced impairment was reversed by estrogen administration (Abu-Taha et al., 2009). Several other studies have identified MCP-1 as being down-regulated by estradiol (Pervin et al., 1998; Arici et al., 1999; Janis et al., 2004) suggesting a role of MCP-1 as an indicator of estrogen change (Tani et al., 2013). All these findings prompted us to determine if Ccl2 gene expression levels changed in the adipose tissue of the OVX females and the impact of pollutants on this endpoint. In agreement with the literature, ovariectomy induced a significant increase of Ccl2 mRNA levels in both the visceral (vAT) and the subcutaneous (scAT) adipose tissues (Fig. 3A; $p < 0.05$). Importantly, the enhanced expression level of Ccl2 was partially prevented in OVX mice exposed to pollutants (Fig. 3A; $p < 0.05$), in line with the hypothesis of an estrogeno-mimetic activity of the mixture of pollutants. Furthermore, the vAT better responded to the pollutant exposure which halved the 3-fold enhancement of Ccl2 gene expression levels linked to OVX (Fig. 3A). The investigation of other chemokines and cytokines indicated that these results were restricted to Ccl2 in the vAT (Fig. 3B). OVX resulted in the enhancement of Ccl5 gene expression levels but exposure to pollutants did not affect its expression level. IL6 gene expression levels did not fluctuate between groups. For IL1β, we also found an effect linked to the OVX operation but no effect of the pollutants in the OVX conditions (Fig. 3B). If considering that among the circulating cytokines and chemokines including MCP-1, IL6 and IL1β, only MCP-1 was found to fluctuate with estrogen plasma levels during the menopausal transition (Tani et al., 2013), it argues that the mixture of pollutants could have exerted some estrogeno-mimetic activity preventing the OVX-

Table 1
Body weight and biochemical characterization of mice. Results are means ± SE (n = 7 to 9). a: $p < 0.05$ HF0-OVX vs HF0-sham; b: $p < 0.05$ HFp-OVX vs HFp-sham; c: $p < 0.05$ HFp-OVX vs HF0-OVX.

	sham		OVX	
	HF0	HFp	HF0	HFp
Body weight (g)	23.0 ± 0.5	23.3 ± 0.7	28.0 ± 1.4[a]	27.1 ± 0.7[b]
blood glucose (mM)	10.4 ± 0.7	9.7 ± 0.9	9.6 ± 0.6	9.5 ± 0.6
insulin (ng/ml)	0.26 ± 0.01	0.28 ± 0.03	0.58 ± 0.1[a]	0.50 ± 0.05[b]
HOMA-IR	2.97 ± 0.23	3.01 ± 0.38	7.56 ± 1.17[a]	5.22 ± 0.47[b]
Free Fatty Acids, FFA (μmol/L)	369.1 ± 37.7	341.4 ± 30.7	602.7 ± 81.6[a]	563.0 ± 33.4[b]
plasma triglycerides, TG (mM)	0.78 ± 0.05	0.72 ± 0.05	0.83 ± 0.03	0.71 ± 0.02[c]
leptin (ng/ml)	19.9 ± 4.2	17.2 ± 1.1	34.7 ± 4.2[a]	34.2 ± 2.8[b]
liver triglycerides (nmol/mg liver)	23.2 ± 2.9	22.5 ± 1.6	26.5 ± 2.1	28.9 ± 3.6

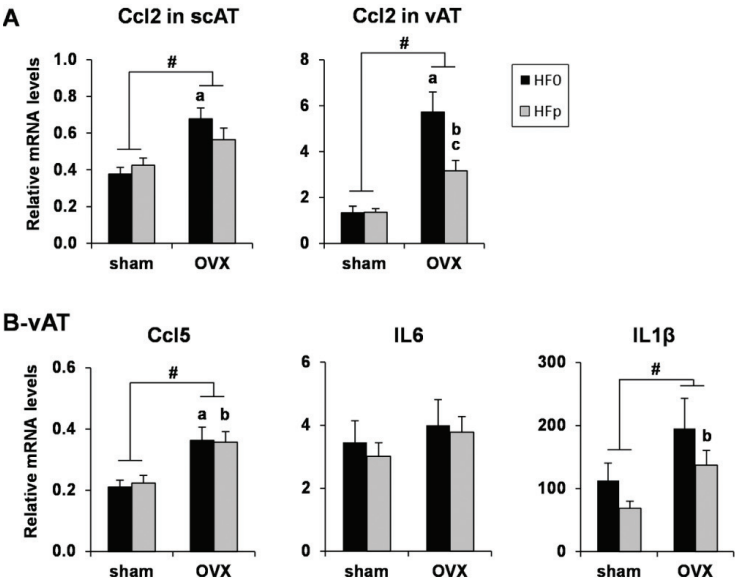


Fig. 3. (A) mRNA expression of *Ccl2* in the subcutaneous adipose tissue (scAT) and the visceral adipose tissue (vAT). (B) expression of genes encoding the inflammatory markers *Ccl5, IL6, IL1b* in the vAT. Results are expressed as mean ± SE (n = 7 to 9); a: $p < 0.05$ HF0-OVX *vs* HF0-sham; b: $p < 0.05$ HFp-OVX *vs* HFp-sham; c: $p < 0.05$ HFp-OVX vs HF0-OVX; #: significant effect of the ovariectomy operation tested by two-way ANOVA.

induced enhancement of Ccl2. However, prevention would not have achieved sufficient levels to impact as well the expression levels of genes encoding IL1β and Ccl5 (Fig. 3). In addition, while MCP-1 has been described as attracting immune cells in the AT (Kanda et al., 2006), we found no changes in the gene expression levels of CD68 used as an indicator of macrophage infiltration in the HFp- compared to the HF0-OVX mice (not shown).

Collectively, the data indicate that the mixture displayed some estrogeno-mimetic activity. It has been demonstrated that metabolic indicators of OVX mice worsened with time along with enhanced inflammatory markers (Benedusi et al., 2015). Although one could again comment on the interest to have a follow-up of the OVX mice during a longer period of time, our data point to insulin sensitivity and Ccl2 gene expression levels as very responsive end-points to estrogen activity.

The AT is not the only source of inflammatory mediators in obesity-associated metabolic disturbances along with the insulin-resistant state. The liver and the muscle could also contribute to these metabolic alterations (Biddinger and Kahn, 2006). Concerning the skeletal muscle, the major organ of glucose uptake and utilization (Biddinger and Kahn, 2006), we found no differences in the response profile during the insulin-sensitivity tests between the HF0-OVX and HFp-OVX groups (data not shown) eluding the possibility that insulin resistance linked to pollutant exposure in conditions of estrogen deficiency originated from the muscles. In addition, there were no differences in the muscle weight between the 2 OVX groups (data not shown).Therefore, we next focused on the liver.

3.3. Pollutants enhanced E2 signalling in the liver in conditions of estrogen deficiency

The liver orchestrates glucose and lipid metabolisms as well as drug disposition, all pathways shown to be targeted by the mixture of pollutants in lifelong exposed intact adult females (Naville et al., 2013). In addition, in the liver, estrogens are known to enhance insulin sensitivity through interacting with the estrogen receptor α encoded by the Esr1 gene, the only estrogen receptor in the liver of rodents (Leiter and Chapman, 1994; Mauvais-Jarvis, 2011; Zhu et al., 2013). Previously, we postulated that the observed aggravation of glucose intolerance in intact females lifelong exposed to the mixture of pollutants may have originated from a decreased Esr1 expression coupled to an enhanced expression of Sult1e1 which could have reduced estrogen bioavaibility (Naville et al., 2013). We thus measured these two genes in the HF0- and HFp-OVX females. Interestingly, we found enhanced Esr1 mRNA expression levels ($p < 0.05$) and a slight trend for the corresponding 66 kDa protein in HFp-OVX which may have contributed to the alleviation of glucose tolerance (Fig. 4A). However, EST mRNA levels were reduced to their nadir after ovariectomy with no change in the pollutant-exposed mice along with circulating estrogen levels reduced to low levels (data not shown). These findings are consistent with the literature indicating that EST gene expression depends on estrogen levels and that its involvement in the regulation of estrogen bioavaibility is lost in ovariectomized animals (Cho et al., 2012).

We also quantified a series of genes by RT-qPCR to determine which pathway(s) could be impacted by pollutants in conditions of estrogen-deficiency that will explain differences in glucose tolerance and insulin sensitivity. However, the expression of genes encoding proteins involved in ß-oxidation or in glucose metabolism was not found altered in the liver of OVX females exposed to pollutants. Genes involved in lipogenesis were not modified either, and this is consistent with the lack of effect of the mixture of pollutants on the hepatic TG levels in the OVX mice (Fig. 4 and Table 1). Specifically, the genes surveyed included the nuclear receptor Nr1c1 encoding peroxisome proliferator-activated receptor-α (PPARα); the transcription factor SREBP1, sterol response element binding protein 1c, encoded by SrebF1; and the carnitine palmitoyl transferase, CPT1α, involved in mitochondrial fatty acid import for β-oxidation. Finally, we also investigated the hepatic gene expression levels of Ccl2 but found no OVX-induced enhancement of Ccl2 (Fig. 4) which may indicate that the liver could cope better than vAT with lower levels of circulating estrogens.

Taken together, we found that the hepatic expression of Esr1 was impacted by pollutants in conditions of estrogen deficiency but not the expression levels of genes involved in fatty acid metabolism or inflammation. Importantly, it has been demonstrated that in mice with a specific deletion of Esr1 in the liver, estrogen replacement in OVX

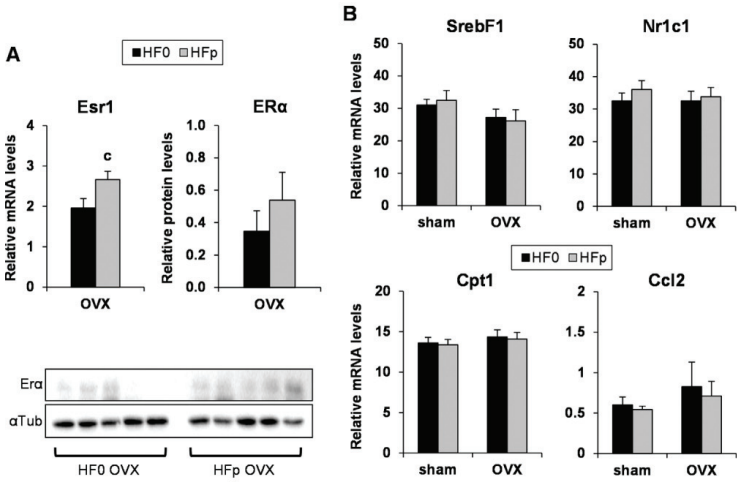


Fig. 4. (A) mRNA and protein expression of ERα (*Esr1*) in the liver of estrogen deficient females. (B) Hepatic expression of genes involved in lipogenesis (*SrebF1*), beta-oxidation (*Nr1c1, Cpt1*) or encoding the inflammatory marker MCP-1 (*Ccl2*). Results are expressed as mean ± SE(n = 5 to 9); **c**: $p < 0.05$ HFp-OVX vs HF0-OVX.

females limited adiposity but failed to improve insulin sensitivity while both adiposity and insulin sensitivity are prevented in mice totally deficient for Esr1 (Zhu et al., 2013). Thus, these findings indicate that hepatic estrogen signalling is required to improve insulin sensitivity in OVX mice. Consequently, as for Ccl2 in AT, the enhanced Esr1 mRNA expression levels detected in the HFp-OVX mice compared to the HF0-OVX mice may well result from the estrogeno-mimetic activity of the mixture of pollutants to which mice have been exposed.

4. Conclusions

In conclusion, we brought here several pieces of evidences suggesting that the mixture of low-dose pollutants made of TCDD, PCB153, BPA and DEHP may exhibit estrogeno-mimetic activity supplying a potential explanation for their benefit effects including enhanced insulin sensitivity and reduced glucose intolerance in a model of ovariectomized mice fed a high-fat high-sucrose diet. Mechanisms could involve, among others, decreased Ccl2 gene expression levels in vAT and enhanced Esr1 gene expression levels in the liver. Further studies are warranted to better understand how exposure to the mixture of pollutants at low doses could trigger estrogeno-mimetic activity and if such activity is the result of additive, antagonist or synergistic effects of one or several of the pollutants present in the mixture. Importantly, these data extend our previous findings demonstrating that exposure to a mixture at doses around the Tolerable Daily Intake range have metabolic effects in a rodent model and that the effects in females are dependent on the estrogen endocrine milieu. Because of the very low doses of pollutants used in mixture, these findings may have strong implications in terms of understanding the potential role of environmental contaminants in the development of metabolic diseases, specifically in females during the menopausal transition.

Funding

This research project was supported by INSERM to Inserm U1060. Emmanuel Labaronne was a recipient of "Région Rhône-Alpes", France. Benoit Julien is supported by a research fellowship from the French "Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche". The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Ethics approval and consent to participate

The protocol for handling mice has been approved by the Regional Committee of Ethics for Animal Experiments and the French Ministry for Higher Education and Research.

Competing interests

The authors declared that they have no competing interests exist.

Authors' contribution

Experimental design: BJ, CP, NV, EL, DN, BLMB; Data acquisition and analysis: BJ, DN, BLMB; Writing the manuscript: BLMB, DN and HV. All authors read and approved the final manuscript

Acknowledgments

We gratefully acknowledge Patrick Manas for animal care.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.11.008.

References

Abu-Taha, M., Rius, C., Hermenegildo, C., et al., 2009. Menopause and ovariectomy cause a low grade of systemic inflammation that may be prevented by chronic treatment with low doses of estrogen or losartan. J. Immunol. 183, 1393–1402.
Appenzeller, B.M.R., Hardy, E.M., Grova, N., et al., 2017. Hair analysis for the biomonitoring of pesticide exposure: comparison with blood and urine in a rat model. Arch. Toxicol. 91, 2813–2825.
Arici, A., Senturk, L.M., Seli, E., et al., 1999. Regulation of monocyte chemotactic protein-1 expression in human endometrial stromal cells by estrogen and progesterone. Biol. Reprod. 61, 85–90.
Barouki, R., Gluckman, P.D., Grandjean, P., et al., 2012. Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. Environ. Health 11, 42.
Benedusi, V., Martini, E., Kallikourdis, M., et al., 2015. Ovariectomy shortens the life span of female mice. Oncotarget 6, 10801–10811.
Bergman, R.N., Ader, M., 2000. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. Trends Endocrinol. Metab. 11, 351–356.
Biddinger, S.B., Kahn, C.R., 2006. From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes. Annu. Rev. Physiol. 68, 123–158.
Camporez, J.P., Jornayvaz, F.R., Lee, H.Y., et al., 2013. Cellular mechanism by which

estradiol protects female ovariectomized mice from high-fat diet-induced hepatic and muscle insulin resistance. Endocrinology 154, 1021–1028.
Casals-Casas, C., Desvergne, B., 2011. Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. Annu. Rev. Physiol. 73, 135–162.
Cho, H.J., Jun, H.J., Lee, J.H., et al., 2012. Acute effect of high-dose isoflavones from Pueraria lobata (Willd.) Ohwi on lipid and bone metabolism in ovariectomized mice. Phytother. Res. 26, 1864–1871.
Dorne, J.L., 2010. Metabolism: variability and risk assessment. Toxicology 268, 156–164.
EFSA, E. F. S. A. P. 2015. Scientific opinion on bisphenol A. www.efsa.europa.eu/sites/default/files/…/factsheetbpa150121.pdf.
EUROPEAN, 2005. Food Safety Authority Panel On Food Additives, F., Processing Aids And Materials In Contact With Food 2005. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) for use in food contact materials. Question N° EFSA-Q-2003-191. EFSA J. 243, 1–20.
Gore, A.C., Chappell, V.A., Fenton, S.E., et al., 2015. EDC-2: the endocrine society's second scientific statement on endocrine-Disrupting chemicals. Endocr. Rev. 36, E1–E150.
Heindel, J.J., Blumberg, B., Cave, M., et al., 2017. Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. Reprod. Toxicol. 68, 3–33.
Hotamisligil, G.S., 2006. Inflammation and metabolic disorders. Nature 444, 860–867.
Janesick, A.S., Blumberg, B., 2016. Obesogens: an emerging threat to public health. Am. J. Obstet. Gynecol. 214, 559–565.
Janis, K., Hoeltke, J., Nazareth, M., et al., 2004. Estrogen decreases expression of chemokine receptors: and suppresses chemokine bioactivity in murine monocytes. Am. J. Reprod. Immunol. 51, 22–31.
Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., et al., 2006. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. J. Clin. Invest. 116, 1494–1505.
Kim, W.K., Choi, E.K., Sul, O.J., et al., 2013. Monocyte chemoattractant protein-1 deficiency attenuates oxidative stress and protects against ovariectomy-induced chronic inflammation in mice. PLoS One 8, e72108.
Le Magueresse-Battistoni, B., Vidal, H., Naville, D., 2015. Lifelong consumption of low-dosed food pollutants and metabolic health. J. Epidemiol. Commun. Health 69, 512–515.
Le Magueresse-Battistoni, B., Labaronne, E., Vidal, H., Naville, D., 2017. Endocrine disrupting chemicals in mixture and obesity, diabetes and related metabolic disorders. World J. Biol.Chemi. 26, 108–119.
Lee, D.H., Porta, M., Jacobs Jr, D.R., et al., 2014. Chlorinated persistent organic pollutants, obesity, and type 2 diabetes. Endocr. Rev. 35, 557–601.
Leiter, E.H., Chapman, H.D., 1994. Obesity-induced diabetes (diabesity) in C57BL/Ks: j mice produces aberrant trans-regulation of sex steroid sulfotransferase genes. J. Clin. Invest. 93, 2007–2013.
Mauvais-Jarvis, F., Clegg, D.J., Hevener, A.L., 2013. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. Endocr. Rev. 34, 309–338.
Mauvais-Jarvis, F., 2011. Estrogen and androgen receptors: regulators of fuel homeostasis and emerging targets for diabetes and obesity. Trends Endocrinol. Metab. 22, 24–33.
Mauvais-Jarvis, F., 2015. Sex differences in metabolic homeostasis, diabetes, and obesity. Biol. Sex Differ. 6, 14.
Monteiro, R., Teixeira, D., Calhau, C., 2014. Estrogen signaling in metabolic inflammation. Mediators Inflamm. 2014, 615917.
Nadal, A., Quesada, I., Tuduri, E., et al., 2017. Endocrine-disrupting chemicals and the regulation of energy balance. Nat. Rev. Endocrinol.
Naville, D., Rebourcet, D., Chauvin, M.A., et al., 2011. Direct and indirect impact of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on adult mouse Leydig cells: an in vitro study. Toxicol. Lett. 207, 251–257.
Naville, D., Pinteur, C., Vega, N., et al., 2013. Low-dose food contaminants trigger sex-specific: hepatic metabolic changes in the progeny of obese mice. FASEB J. 27, 3860–3870.
Naville, D., Labaronne, E., Vega, N., et al., 2015. Metabolic outcome of female mice exposed to a mixture of low-dose pollutants in a diet-induced obesity model. PLoS One 10, e0124015.
Pervin, S., Singh, R., Rosenfeld, M.E., et al., 1998. Estradiol suppresses MCP-1 expression In vivo: implications for atherosclerosis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 18, 1575–1582.
Riant, E., Waget, A., Cogo, H., et al., 2009. Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. Endocrinology 150, 2109–2117.
Tani, A., Yasui, T., Matsui, S., et al., 2013. Different circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 during the menopausal transition. Cytokine 62, 86–90.
Tateya, S., Tamori, Y., Kawaguchi, T., et al., 2010. An increase in the circulating concentration of monocyte chemoattractant protein-1 elicits systemic insulin resistance irrespective of adipose tissue inflammation in mice. Endocrinology 151, 971–979.
Trasande, L., Zoeller, R.T., Hass, U., et al., 2016. Burden of disease and costs of exposure to endocrine disrupting chemicals in the European Union: an updated analysis. Andrology 4, 565–572.
Van Leeuwen, F.X., Feeley, M., Schrenk, D., et al., 2000. Dioxins: WHO's tolerable daily intake (TDI) revisited. Chemosphere 40, 1095–1101.
Vandenberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., et al., 2012. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. Endocr. Rev. 33, 378–455.
WHO, 2003. Polychlorinated Biphenyls: Human Health Aspects. Concise International Chemical Assessement Document 55. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
WHO 2016. World Health Organization, Diabetes, Fact sheet 312. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/.
Zhu, L., Brown, W.C., Cai, Q., et al., 2013. Estrogen treatment after ovariectomy protects against fatty liver and may improve pathway-selective insulin resistance. Diabetes 62, 424–434.
Zoeller, R.T., Brown, T.R., Doan, L.L., et al., 2012. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. Endocrinology 153, 4097–4110.

2 Article 2

Le statut œstrogénique régule de manière différentielle le foie et le tissu adipeux chez les souris femelles nourries avec un régime alimentaire riche en saccharose et en graisses. Impact d'une exposition chronique à un mélange de polluants à faibles doses.

Article 2 (en révision)

Journal of Nutritional Biochemistry, 2019

Estrogen withdrawal and replacement differentially target liver and adipose tissues in female mice fed a high-fat high-sucrose diet. Impact of a chronic exposure to a low-dose pollutant mixture.

Julien B., Pinteur C.[1], Vega N.[1], Vidal H., Naville D., Le Magueresse-Battistoni B

[1] These authors contributed equally.

Résumé

Parmi les polluants présents dans l'environnement, un grand nombre d'entre eux appartiennent à la famille des perturbateurs endocriniens. L'exposition à ces molécules capables d'interférer avec le système hormonal pourrait présenter un risque chez les femmes ménopausées ayant un déficit hormonal. En effet, nos précédents travaux (Naville D., 2015 ; Julien B., 2018) suggéraient une activité œstrogéno-mimétique d'un mélange de quatre polluants environnementaux (dioxine, PCB, phtalate, BPA) faiblement dosés, dans un modèle de déficience en œstrogènes chez les souris ovariectomisées nourries au régime gras-sucré. Afin de mieux comprendre l'impact métabolique de ce mélange de polluants en condition de déficit hormonal, nous avons réalisé une caractérisation complète du phénotype métabolique des femelles ovariectomisées en explorant le foie, le tissu adipeux sous-cutané (TAsc) et le tissu adipeux viscéral (TAv). Une supplémentation en œstradiol chez ces souris a été réalisée afin d'évaluer les effets œstrogéno-mimétiques des polluants.

Toutes les procédures ont été effectuées avec l'approbation du comité régional d'éthique pour l'expérimentation animale. Des souris femelles C57BL/6J âgées de 5 semaines ont été exposées à une alimentation riche en gras et en saccharose (HFHS) contenant ou non un mélange de polluants (2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine [TCDD], polychlorobiphényle 153 [PCB153], bisphénol A [BPA] et phtalate de diéthylhexyle [DEHP]), chacun étant utilisé à une dose proche de sa dose journalière tolérable. A l'âge de 7 semaines, les souris ont subi (OVX) ou non (sham) une ovariectomie – comme décrit dans l'étude précédente (**article 1**) – suivie par l'administration d'implants sous-cutanés contenant ou non de l'œstradiol benzoate dans de l'huile de sésame. Le poids et la prise alimentaire ont été enregistrés chaque semaine, jusqu'à l'âge de 20 semaines. La composition corporelle a été analysée un jour avant l'euthanasie par résonance magnétique nucléaire. La taille des adipocytes a été évaluée par immunomarquage de la laminine présente dans la membrane basale. Plusieurs paramètres sanguins, la tolérance au glucose, la résistance à l'insuline ainsi que l'expression d'un certain nombre de gènes dans le tissu adipeux et le foie ont été mesurés.

Nous confirmons un certain nombre de résultats de la littérature sur les conséquences de l'ovariectomie, comme la prise de poids, l'aggravation de l'intolérance au glucose, l'hyperinsulinémie et l'insulino-résistance induites par le régime HFHS, tandis que l'administration d'E2 normalise ces paramètres métaboliques. Parallèlement, l'ovariectomie ne modifie pas les niveaux plasmatiques et hépatiques de cholestérol et de triglycérides. La

RT-qPCR réalisée dans le foie montre que l'E2 exacerbe l'expression d'*Esr1* ainsi que d'un ensemble de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol (*Srebf2, Hmgcr, Cyp7a1*). Dans le tissu adipeux, l'ovariectomie régule différemment l'expression des récepteurs aux hormones stéroïdes (*Esr1*, *Esr2*, *Gper1* et *AR*), mais de manière similaire entre le TAsc et le TAv. Cette similarité de réponse entre les deux dépôts lipidiques n'est cependant pas retrouvée pour tous les gènes étudiés. L'ovariectomie augmente l'expression de gènes impliqués dans l'adipogenèse (*Fabp4*, *Lipe*, *Lpl*) dans le TAsc, alors qu'elle induit l'expression de marqueurs de l'inflammation (*Tnfa*, *Il1b*, *Il12a*) dans le TAv. De manière intéressante, l'exposition aux polluants chez les souris ovariectomisées s'accompagne d'une augmentation d'*Esr1* dans le TAsc et du ratio *Esr1*/*AR* dans les deux dépôts graisseux, mimant les effets du traitement par l'E2. Dans le foie, les polluants affectent *Nr1h3*, *Nr0b2*, *Cd36* et *Cyp7a1*, mais pas *Esr1*, d'une manière distincte de celle déclenchée par l'E2.

En raison des très faibles doses de polluants utilisées dans le mélange, ces résultats pourraient avoir des conséquences sur la compréhension du rôle potentiel des contaminants de l'environnement dans le développement de maladies métaboliques, en particulier chez les femmes pendant la transition ménopausique.

Estrogen withdrawal and replacement differentially target liver and adipose tissues in female mice fed a high-fat high-sucrose diet. Impact of a chronic exposure to a low-dose pollutant mixture.

Benoit Julien, Claudie Pinteur[1], Nathalie Vega[1], Hubert Vidal, Danielle Naville and Brigitte Le Magueresse-Battistoni,

Affiliations:

Univ-Lyon, CarMeN laboratory, INSERM U1060, INRA U1397, Université Claude Bernard Lyon1, INSA Lyon, **Charles Mérieux Medical School**, F-69600 Oullins, France

[1] These authors contributed equally

Corresponding author:

Dr. B. Le Magueresse-Battistoni, PhD

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

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

E-mail : brigitte.lemagueresse@inserm.fr

Running title: Metabolic disorders, estrogens and pollutants

Funding sources: This research project was supported by INSERM to InsermU1060. Benoit Julien is supported by a research fellowship from the French "Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche". The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Key words: high-fat high-sucrose diet; mixture of pollutants; metabolic disorders; ovariectomy; œstradiol replacement;

Abbreviations:

ALAT, alanine aminotransferase ; ASAT, aspartate aminotransferase, AUC, area-under-curve; BPA, bisphenol A; bw, body weight ; DEHP, diethylhexyl phthalate; DMSO, dimethylsulfoxide; E2, 17β œstradiol ; FFA, free fatty acid; GTT, glucose tolerance test; HFHS, high- fat high sucrose; PCB, polychlorinated biphenyl; TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin; TDI, Tolerable Daily Intake; TG, triglyceride.

Abstract

Post-menopausal women may be at particular risk when exposed to chemicals especially endocrine disruptors because of hormonal deficit. To get more insight, ovariectomized C57Bl6/J mice fed a high-fat high-sucrose diet were chronically exposed from 5 to 20 weeks of age to a low-dose mixture of chemicals with one dioxin, one polychlorobiphenyl, one phthalate and bisphenol A. Part of the mice received as well E2 implants to explore the potential estrogenic dependency of the metabolic alterations. With this model, estrogen loss resulted in glucose but not lipid metabolism impairment and E2 replacement normalized the enhanced body and fat pad weight, and the glucose intolerance and insulin resistance linked to ovariectomy. It also altered cholesterol metabolism in the liver concurrently with enhanced estrogen receptor *Esr1* mRNA level. In addition, fat depots responded differently to estrogen withdrawal (e.g., selective mRNA enhancement of adipogenesis markers in subcutaneous and of inflammation in visceral fat pads) and replacement challenges. Importantly, the pollutant mixture impacted lipid deposition and mRNA expression of several genes related to lipid metabolism but not *Esr1* in the liver. Adiponectin levels were altered as well. In addition, the mRNA abundance of the various estrogen receptors was regionally impacted in fat tissues. Besides, xenobiotic processing genes did not change in response to the pollutant mixture, in the liver. The present findings bring new light on estrogen-dependent metabolic alterations with regards to situations of loss of estrogens as observed after menopause.

Bullet points:

Estrogens differentially impacted hepatic glucose and lipid metabolism in female mice

Estrogens differentially impacted visceral and subcutaneous fat depots

Exposure to pollutants altered lipid deposition in liver and adiponectin levels

Pollutants impacted E2-regulated gene mRNA levels in a tissue-dependent manner

Mixture contained pollutants at the tolerable daily intake dose

1. Introduction

Obesity-related metabolic dysfunctions constitute a major problem in Public Health. Over 1.9 billion adults were overweight, of those 650 million were obese in 2016 placing them at high risk for metabolic diseases including type 2 diabetes [1]. Risk of obesity is not equal between males and females. Sex differences appeared as the population aged. In 2005, 16-17% of women *vs* 10-11% of men over 50 were obese [2]. Risk of obesity in females is associated with metabolic changes occurring during the menopausal transition characterized by progressive reduction of ovarian estrogen production. According to different studies, the prevalence of the metabolic syndrome which is a cluster of conditions of dyslipidemia, central adiposity, hypertension, abnormal glucose metabolism and insulin resistance is enhanced among postmenopausal women varying between 30 to 70% compared with 14-45% in younger women [3] delineating the post-menopausal women as a vulnerable population.

Metabolic disorders are multifactorial diseases. Besides genetic predispositions and imbalance between energy intake and expenditure, environmental pollutants have been suggested to be etiologic factors as well, based on robust epidemiologic data and experimental studies demonstrating changes in body weight and/or insulin resistance [4-7]. Environmental pollutants may include persistent chemicals which bioaccumulate in the food chain. They are especially present in fatty foods of animal origin (meat, milk, fish) and characterized by half-lives of several years in humans, e.g. dioxins and polychlorobiphenyls [8]. Other pollutants may have short half-lives e.g. phthalates and bisphenols. However, as these chemicals are massively used in plastic goods, the leaching from packaging causes contamination resulting in a chronic exposure [9, 10]. Pollutants are under regulation by international risk assessment evaluation bodies (e.g., the European Food Safety Agency, EFSA). However, the cocktail effect resulting from the chronic exposure to a myriad of chemicals originating from different sources (foods and beverages, air breathing, skin absorption of cosmetics) and to which the human population is involuntary exposed is underappreciated [11-13]. Of striking importance are chemicals identified for their ability to interfere with hormonal action, the so-called endocrine disruptors [14]. Populations vulnerable because of hormonal deficits such as post-menopausal women may thus be at particular risk when exposed to these chemicals. It has consistently been found that among a population of obese and post-menopausal women, plasma levels of persistent organic pollutants (POPs) were associated with insulin resistance [15].

The estrogeno-mimetic properties of endocrine disruptors are of particular concern. Characterizing their mechanisms of actions could help to explain their deleterious impact on the reproductive functions but also on metabolic disorders [10]. Indeed, it has been well demonstrated that estrogens exert protective roles against metabolic diseases in addition to regulating reproductive functions. They are for instance known to positively regulate glucose homeostasis and lipid metabolism favoring insulin sensitivity [5, 16-18]. All these beneficial effects progressively disappear with menopause. Estrogens act through specific receptors distributed centrally and peripherally including ERα, ERβ and the G-protein-coupled receptor GPR30 which differ in abundance and tissue distribution in a sex-dependent manner [16, 19, 20]. Non-genomic actions of estrogens as well as cross-talk with various nuclear receptors and/or transcription factors have also been evidenced [21, 22]. All these signaling pathways result in pleiotropic actions of estrogens in the peripherally and metabolically active tissues including the liver and the adipose tissues which express the estrogen receptors. Thus, these signaling pathways are potential targets for endocrine disruptors in a manner dependent on the age, the sex and the tissue considered [4, 23, 24].

We previously demonstrated that a mixture of low-dose pollutants made of dioxin, PCB, phthalate and bisphenol A (BPA) could interfere with estrogen signaling and trigger hepatic insulin resistance and aggravation of glucose intolerance in female mice fed a high-fat high-sucrose diet [25]. In addition, mice fed a standard diet but exposed to the same mixture of pollutants exhibited enhancement of hepatic triglycerides content and insulin resistance [26]. The impact of this pollutant mixture depended on the age of the mice, with differences occurring between mature and immature females [25, 27]. However, the metabolic impact of the mixture of pollutants in conditions of hormonal deficit after ovariectomy to mimic menopause and hormonal replacement using 17β estradiol (E2) pellets implanted subcutaneously, has not yet been explored. The purpose of the current study was to fill this gap. After characterizing the metabolic phenotypes of liver, subcutaneous and visceral adipose tissues in ovariectomized mice, we delineated the estrogenic component using hormonal replacement.

2. Materials and methods

2.1. Animals, diets and experimental design

A schematic view of the 3 experimental protocols is described in Supplemental Figure 1. C57Bl/6 female mice (4-week-old) were purchased from Envigo laboratories (Gannat, France), housed by 2 in polypropylene cages (to avoid BPA leaching from polycarbonate cages) at 21°C with a normal light-dark cycle and free access to water (polypropylene bottles) and standard chow (LASvendi-16R; Soest, Germany). After one week of acclimatization, mice of the experimental protocol 1 were fed a high fat-high sucrose (HF) diet (from Envigo) containing (HFp) or not (HF0) a mixture of pollutants (see below for the details). At 7 weeks of age, mice were sham-operated (HF0 sham) or underwent a bilateral ovariectomy after general anesthesia, as previously described [28] followed by the implantation, under the neck skin, of Silastic implants filled either with vehicle (HF0 Ovx and HFp Ovx) or with 50µg of 17β-estradiol-3-benzoate, E2 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) in 30µl of sesame oil (HF0 Ovx+E2 and HFp Ovx+E2) as described [29]. The implants were renewed at 13 weeks of age (8 weeks of diet) as the release of E2 was effective only 6 weeks based on body weight follow-up performed in a pilot experiment (data not shown). In the course of the study, two other protocols were conducted to assess the individual effects of the HF diet and of the ovariectomy (Supplemental Figure 1). All procedures were performed with the approval of the Regional Committee of Ethics for Animal Experiments and the French Ministry for Higher Education and Research. Body weight (for all protocols) and food intake (for protocol 1) were recorded weekly throughout the protocol until mice were 20 weeks of age. Validation of the surgery was assessed at the time of mouse euthanasia with the observation of uterine atrophy in the Ovx females (measurement of uterus weight; Supplemental Figure 2). Food intake measured in Protocol 1 did not change between groups, regardless of treatments (data not shown).

The pollutant mixture was made of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD, CAS n° 1746-01-6 from LGC-Promochem, Molsheim, France), polychlorinated biphenyl (PCB) 153 (CAS n°35065-27-1), bisphenol A (BPA, CAS n°80-05-7) and di-[2-ethylhexyl]-phthalate (DEHP, CAS n°117-81-7) (all three from Sigma-Aldrich). Each pollutant was used at a dose close to its tolerable daily intake (TDI) reference dose of either the pollutant itself (DEHP, BPA) or representative congeners (TCDD, PCB153) [25]. Pollutants were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and diluted in corn oil to facilitate uniform homogenization in the food and the making of pellets. Pollutant-free diet contained identical volumes of DMSO and corn oil as the pollutant-containing food.

HF0 and HFp diets contained 63% fat, 23.6% carbohydrate and 13.4% protein in kcal, as detailed previously [26]. To globally ensure the daily exposure to 2pg/kg bw/d of TCDD, 80 ng/kg bw/d of PCB153, 50µg/ kg bw/d of DEHP and 5 µg/ kg bw/d of BPA, 1 g of contaminated food per 17 g of body weight was given per day to mice otherwise fed ad libitum as previously described [25, 27].

2.2. Metabolic tests

After 13 wks of diet, 16 h-fasted mice were injected intraperitoneally with glucose (1 mg/g of body weight) for the glucose tolerance test (GTT). Blood glucose was measured using the Accu-Chek Performa glucometer (Roche Diabetes Care France, Meylan).

2.3. Body composition, blood and tissue collection

One day before euthanasia, weight and whole body composition were analyzed using nuclear magnetic resonance (Minispec TD-NMR, Bruker BioSpin). Following a 6 hour fasting, blood was collected by retro-orbital sampling. Mice were euthanized by cervical dislocation and liver, inguinal subcutaneous (SAT) and visceral (periovarian+parametrial, VAT) adipose tissue were quickly dissected, snap-frozen in nitrogen liquid and conserved at -80°C until experiments. Small pieces of SAT and VAT were fixed in 4% buffered formaldehyde and embedded in paraffin for histology studies.

Blood glucose concentrations (Accu-Chek Performa glucometer) as well as plasma levels of insulin (Mouse Ultrasensitive ELISA, Eurobio), triglycerides (Biolabo, Maizy, France), cholesterol, free fatty acids (FFA), alanine aminotransferase (ALAT) and aspartate aminotransferase (ASAT) activities (Sigma-Aldrich), leptin and adiponectin (Crystal Chem, Zaandam, Netherlands) were measured. Total cholesterol and triglycerides were also measured in the liver after extraction of lipids from frozen liver samples using a lipid Extraction kit chloroform-free (Clinisciences, Nanterre, France).

Adipose tissue histology

Paraffin-embedded adipose tissues were cut and adipocyte area was assessed by immunostaining of the basal membrane realized on 4µm sections using the rabbit anti-laminin antibody (1:100, Merck, L9393). Image acquisition was obtained with the AXIOVERT 200 M inversed fluorescent microscopes (Carl Zeiss S.A.S., Marly le Roi,

France) equipped with the AxioVision 4.8.2 software. Analyses were performed using the ImageJ software.

2.4. Real time PCR analysis

Total RNA extracted from frozen tissue samples was reverse-transcribed and analyzed by real-time PCR as described [30] using a set of specific primers (Supplemental Table 1). In each tissue data were normalized relatively to TBP (encoding TATA-Box Binding Protein).

2.5. Statistical analysis

All results are expressed as means ± SEM and differences between means were considered significant at *p*-value <0.05. To test for statistical significance, one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test was used when comparing HF0 sham, HF0 Ovx and HF0 Ovx+E2 groups. To test for pollutant effects, two-way ANOVA for non-repeated measures with E2 and pollutants as factors was used, followed by a Bonferroni post hoc test. When significant effects without interaction were obtained, differences were tested using Student's t-test between the pollutant-exposed group and the non-exposed group. GraphPad Prism 5.0 software was used for all statistical analysis.

3. Results

3.1. Metabolic characterization of sham and ovariectomized females fed a HF diet and effect of 17β æstradiol replacement

Sham-operated (sham) and ovariectomized (Ovx) females having received E2 or vehicle supplementation, all fed a HF diet were thoroughly characterized (Protocol 1). Non-operated females fed either a standard diet or a HF diet were monitored in parallel (Protocol 3). As expected, females fed the HF diet were significantly heavier than ST fed mice with high levels of blood glucose and plasma insulin levels resulting in a 3-fold increase of the HOMA-IR (Fig. 1A-B; Supplemental Figure 3) which is an index of insulin resistance. Ovariectomy induced an additional increase of body weight and fat mass, a hyperglycaemia after a 16h fasting (time 0 of the GTT) with a trend after a 6h fasting (blood sample at euthanasia), and elevated insulin plasma levels, all resulting in glucose intolerance (GTT) and insulin

resistance (enhanced HOMA-IR) (Fig. 1). Conversely, triglycerides (TG) and cholesterol levels (both plasma and liver) were not significantly impacted by ovariectomy (Table 1). These metabolic features were also observed in Protocol 2 in which ovariectomy was performed in mice fed a standard diet (Supplemental Figure 4). Neither ovariectomy nor E2 treatment induced liver toxicity as there was no increase in plasma AST or ALT in HF0 Ovx and HF0 Ovx+E2 mice (data not shown).

Estradiol supplementation to HF0 Ovx mice led to a restoration of insulin and FFA plasma levels as well as glucose tolerance to values measured in HF0-sham mice (Fig. 1; Table 1). Other metabolic parameters including glycaemia, body weight, VAT and SAT weight, plasma cholesterol (total and cholesteryl esters) and leptin levels were significantly lower than those measured in HF0 sham mice (Fig. 1 and Table 1). For some parameters, the range of values was identical to those in standard-fed mice (Fig. 1). Besides, impedance analyses revealed enhanced lean mass and reduced fat mass in E2-replaced Ovx mice compared to HF-fed sham mice (Fig. 1D) which is probably associated to the reduced adipocyte diameter observed in both AT depots (Fig. 1D and Supplemental Figure 5) with E2 replacement. Moreover, adiponectin levels, not affected by ovariectomy, were reduced in E2-replaced females (Table 1) as reported elsewhere [31].

3.2. Fat depots were differently affected in response to ovariectomy and 17ß æstradiol supplementation

The metabolic explorations showed that the adipose tissue was highly responsive to ovariectomy and E2 replacement consistent with estrogens playing major roles in fat tissue deposition and expansion in females [16, 32]. To go further in-depth, we analyzed by RT-qPCR a panel of genes encoding the estrogen receptors and markers of adipogenesis or inflammation. We observed that the expression level of *Esr1* and *Esr2* genes encoding the nuclear estrogen receptor (ER) α and β, respectively and *Gper1* encoding the G protein coupled estrogen receptor 1 (GPR30) responded differently to estrogen withdrawal and replacement. *Esr1* mRNA levels were unchanged in Ovx females but significantly increased (2-fold) upon E2 replacement in both SAT and VAT. *Gper1* and *Esr2* mRNA levels were significantly higher and lower, respectively, in Ovx than in sham females. E2 replacement corrected these effects in SAT but not in VAT (Fig. 2). The pattern of expression of *Nr3c4* (encoding the androgen receptor) and *Esr1* mRNA was quite similar in SAT and VAT (i.e.,

almost no change following ovariectomy and augmentation following E2 replacement relative to sham mice) (Fig 2). Additionally, ten-fold more *Esr1* and 1.5-fold more *Nr3c4* mRNA levels were found in VAT than in SAT, and 2-fold more *Gper1* mRNA levels were found in SAT than in VAT. As for *Esr2*, mRNA levels were low in both fat pads with large fluctuations in the VAT of sham mice (Fig. 2).

Plasma leptin levels of Ovx females (Table 1) which correlated with obesity were consistent with the increase of *lep* mRNA levels. They returned to sham levels in SAT and VAT of E2-treated mice (Fig. 3). A similar pattern of mRNA expression was observed for *Ccl2* which encodes the monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1) along with estrogen loss and recovery challenges in both fat pads (Fig. 4). Conversely, fluctuations in level of adipogenesis, lipogenesis, lipolysis and inflammation markers were found to vary in fat depots according to body localization i.e., subcutaneous or visceral (Fig. 3, 4). Specifically, we surveyed *Nr1c3* encoding peroxisome proliferator-activated receptor PPARγ, *Fabp4* encoding fatty-acid binding protein4, *Lipe* encoding hormone-sensitive lipase (HSL), *Lpl* encoding lipoprotein lipase (LPL), *Pnpla2* encoding Patatin Like Phospholipase Domain Containing 2 also known as Adipose triglyceride lipase (ATGL) and inflammatory cytokines, *Tnfα*, *Il1β* and *Il12a* encoding tumor necrosis factor (TNF)α and the interleukins 1ß and 12a, respectively. On the one hand, no variations were observed in the level of *Nr1c3*, *Pnpla2*, *Tnfα* and *Il12a* mRNA in SAT across the groups, while the same genes were up-regulated in VAT in the Ovx group. Specifically, VAT samples from E2-replaced females had higher mRNA levels of *Nr1c3* and *Pnpla2* than samples from Ovx females which was consistent with PPARγ being a direct transcriptional regulator of ATGL [33] while inflammatory marker mRNA levels increased in Ovx females and returned to sham levels in E2-replaced females (Fig. 3, 4). On the other hand, *Fabp4*, *Lipe* and *Lpl* had a profile of gene expression consistent with estrogens negatively regulating these genes in SAT but not in VAT samples (Fig. 3, 4). Regarding *Il1β*, the profile was identical to the other inflammatory markers in VAT while the mRNA levels were enhanced following E2 replacement in SAT.

3.3. ***Estrogens differentially impact glucose and lipid metabolism in the liver***

Estrogens act in liver to positively regulate insulin sensitivity and glucose tolerance [16]. ERα being the primary estrogen receptor expressed in mouse liver [34], we explored the hepatic expression of the *Esr1* gene in ovariectomized females. We observed a significant decrease

of *Esr1* mRNA levels (Fig. 5A). Interestingly, in E2-replaced Ovx mice a significant doubling in *Esr1* mRNA levels was measured compared to those detected in sham mice. We next performed RT-qPCR analyses to discriminate, among genes regulating glucose and lipid metabolism, those under negative and positive estrogen regulation. Consistent with E2 positively regulating glucose tolerance, the expression levels of *G6pc* encoding the catalytic subunit of the gluconeogenic enzyme G6Pase (glucose-6 phosphatase) doubled in Ovx mice and was restored in E2-replaced females, relative to the level of sham mice (Fig. 5B). Expression levels of *Gck* encoding Glucokinase, mirrored those of *G6pc* (Fig. 5B) consistent with an adaptive role of *Gck* in counteracting hyperinsulinemia and insulin resistance and with the reduction of glycaemia [35].

To complete the study and although we did not observe significant changes in hepatic TG and cholesterol levels in ovariectomized mice (Table 1), we undertook a comprehensive analysis of genes encoding proteins involved in hepatic lipid metabolism. Specifically, genes surveyed included *Nr1h3* encoding Liver X receptor (LXR)α and its downstream target gene *Srebf1* encoding sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP1c), a master regulator of *de novo* lipogenesis; *Scd1* encoding the stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1), a rate-limiting enzyme of lipogenesis; *Dgat2* encoding diacylglycerol O-acyltransferase 2 which catalyzes the final reaction in the synthesis of triglycerides; *Cd36* encoding Cluster of differentiation 36 involved in fatty acid uptake; *Nr1c1*encoding peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)α which regulates fatty acid oxidation and its target gene *Cpt1a* encoding carnitine palmitoyltransferase 1α; *Srebf2* which encodes the transcription factor Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 2 and its downstream target genes *Hmgcr* and *Pcsk9* encoding 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase, the rate limiting enzyme of cholesterol metabolism and Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 which regulates lipoprotein metabolism, respectively. We surveyed *Ldlr* encoding the low density lipoprotein receptor which mediates the endocytosis of cholesterol-rich LDL; *Nr1h4* encoding the bile acid receptor Farnesoid X receptor (FXR), and *Cyp7a1* encoding the cholesterol 7α hydroxylase which is the rate-limiting enzyme in the synthesis of bile acids [36].

On this panel of genes, *Nr1h4* was unique in that the mRNA level was enhanced by estrogen withdrawal compared to sham mice. There was reduction in mRNA abundance of *Srebf1*, *Dgat2* and *Ldlr* in the Ovx mice (Fig. 5). All returned to sham levels after E2 replacement. Lower *Nr1c1* and *Cd36* mRNA levels were found in E2 replaced mice than in sham mice (Fig. 5); mRNA levels of *Nr0b2* encoding small heterodimeric partner (SHP) and those of

Cpt1α, Nr1h3, Scd1 remained the same between the different groups (data not shown). In addition, several genes belonging to the cholesterol metabolism pathway had their mRNA levels strongly increased following E2 supplementation. This included *Srebf2* and the target genes *Hmgcr*, *Pcsk9* and *Cyp7a1* (Fig. 5E).

3.4 A low-dose mixture of pollutants differentially impacted the expression levels of E2-regulated genes depending on the metabolic tissue explored

The expression levels of estrogen receptors and estrogen-regulated genes were analyzed in the liver and adipose tissues of mice exposed to a mixture of low-dose pollutants previously shown to exhibit estrogeno-mimetic activities [25, 27, 28].

Metabolic exploration revealed that exposure to pollutants did not change food intake (not shown), body weight and fat pad weight of the exposed animals (Supplemental Figure 6). No effect of pollutants was observed on blood glucose and plasma insulin levels, HOMA-IR, glucose tolerance, as well as on TG (plasma and hepatic) and FFA levels (Table 1). Notwithstanding, cholesterol (plasma and hepatic) and leptin levels were significantly increased in HFp-Ovx females compared to HF0 sham mice while these parameters were not significantly changed by ovariectomy itself arguing for a pollutant effect. Moreover, liver TG accumulation in HFp Ovx mice was 1.5-fold higher than in HF0 Ovx mice although it did not reach significance. In addition, its level significantly decreased following E2 replacement (HFp Ovx+E2 *versus* HFp Ovx) which was not observed in pollutant-free conditions (Table 1). Adiponectin levels were significantly different in HFp Ovx+E2 *versus* levels measured in HF0-Ovx+E2 mice which also indicated a pollutant effect (Table 1).

Regarding gene expression, exposure to pollutants resulted in the increase of *Esr1* mRNA levels in SAT and in the ratio of *Esr1* to *Nr3c4* expression in SAT and VAT of Ovx mice (Fig. 6). In conditions of E2 supplementation, effects of pollutant exposure included the augmentation of *Esr2* mRNA levels in both fat pads as well as *Esr1 /Nr3c4* ratio in SAT (HFp Ovx+E2 versus HF0 Ovx+E2) (Fig. 6). Among genes involved in cholesterol metabolism, we observed a significant doubling of *Nr1h3, Nr0b2* and *Cd36* in pollutant-exposed Ovx mice compared to non-exposed Ovx mice. Interestingly, in E2-replaced females, pollutant exposure triggered significant changes in *Cyp7a1* (half-decrease) and *Nr1h3* (a doubling) mRNA levels

(Fig. 6C). These pollutant-induced effects were different than those exerted by E2 replacement (Fig.4).

To complete the study, we measured the expression levels of genes encoding xenobiotic receptors including the aryl hydrocarbon receptor (AhR), the constitutive androstane receptor CAR (Nr1i3) and the pregnane xenobiotic receptor PXR (Nr1i2) as well as CAR and PXR immediate target genes which encode the cytochrome P450 enzymes CYP2B10 and CYP3A11 [37]. These genes were not found impacted by the pollutant mixture as compared to non-exposed mice except *Cyp2b10* which mRNA abundance slightly increased (Supplemental figure 7).

Discussion

In the present study, we developed a model allowing the exploration of the metabolic consequences of ovarian withdrawal and E2 replacement on liver and adipose tissues along with investigating the impact of a low-dose mixture of pollutants previously reported to exhibit some estrogeno-mimetic properties in female mice [25, 27]. Because of differences in the literature regarding the extent of the ovariectomy-induced deleterious metabolic effects, the experimental model developed herein was first characterized. Accordingly [17, 19, 38-40], ovariectomy induced body weight increase, glucose intolerance and insulin resistance and tended toward an increase of leptin and insulin plasma levels. No changes in TG plasma levels and cholesterol or in hepatic lipid deposition could be measured in the ovariectomized mouse model.

Importantly, treatment of ovariectomized mice with E2 either reversed the ovariectomy-induced adverse effects (e.g., glucose tolerance) to sham levels or improved metabolic functions over the physiological levels (e.g., adipose tissue weight and leptin levels). It suggested that diet-induced obesity could impair estrogenic signaling in the adipose tissues in female mice and that part of the HF effects were counter-balanced by E2 supplementation, extending previous data [31]. Importantly, while ovariectomy and E2 replacement similarly regulated the ERs and AR encoding mRNA expression in SAT and VAT depots, adipogenesis and inflammatory markers were differently regulated in response to estrogen withdrawal and E2 replacement. Specifically, our findings were consistent with estrogens negatively regulating adipogenesis in SAT but not in VAT, and inflammation in VAT but not in SAT. In

addition, enhanced *Nr1c3* and *Atgl* mRNA expression in VAT, two markers of adipocyte differentiation, suggested a positive effect of E2-treatment on this tissue in Ovx mice. Extending the literature [41, 42], the herein findings underlined distinct functions of SAT and VAT in the development of obesity-induced metabolic disorders in females, with estrogens regulating fat distribution and expansion preferably in subcutaneous depots and opposing inflammation particularly in VAT thus protecting from insulin resistance. Noticeably, the mRNA abundance changes of the estrogen receptors induced by ovariectomy and E2 replacement emphasized that, in physiological conditions, circulating estrogens could regulate *Gper1* and *Esr2* at a transcriptional level. In addition, if considering the reported phenotypes of enhanced adiposity in *Esr2*-deficient female mice [43] and the protection from diet-induced obesity in *Gper1*-deficient female mice [44], the alterations (herein observed) of *Gper1* and *Esr2* expression in the adipose tissues could well be linked to the obesity phenotype of the Ovx mice. The E2 replacement data suggested that the up-regulation of *Esr1* and *Nr3c4* expression in both fat pads and the restored *Esr2* and *Gper1* mRNA abundance (at least in SAT) could be linked to the observed decreased in adiposity in line with previous data [19, 43, 45]. Moreover, the data presented herein indicated that the described estrogen anti-inflammatory properties [19, 43] could be mediated through ERß in VAT extending previous reports in female mice [46]. Interestingly, SAT and VAT share identically regulated genes including *Ccl2* (in line with previous findings [28]) and *Lep* which could be positively regulated by estradiol in adipose tissues via *Gper1*or negatively via ERß. Such regulations remain to be demonstrated.

Within the present study, ovariectomy clearly impacted glucose metabolism but not hepatic steatosis while E2 replacement resulted in altered cholesterol metabolism concurrently with marked changes in liver *Esr1, Nr1c1* and *Cd36* mRNA abundance linking estrogen signaling to these effects. It could indicate that impairment of glucose metabolism might be an early metabolic consequence of estrogen loss while alteration of lipid metabolism could be indirectly affected. This hypothesis is consistent with the phenotype of hepatosteatosis observed after a long-term ovariectomy [47] but not in the present study. The finding that TG accumulation did not change with ovariectomy is in agreement with the observation that the mRNA levels of FXR, a protein known to oppose hepatic steatosis and hyperlipidemia [48], was increased while the abundance of genes related to lipogenesis (Srebpf1, Dgat2) was reduced. Noticeably, the impairment of cholesterol metabolism observed following E2 supplementation extended previous data demonstrating that Esr1 overexpression could trigger

a loss in the fine tuning of negative feedback regulation of cholesterol synthesis [49]. Deregulation of lipid metabolism may as well result from the lack of cycles in E2-replaced females since it has been demonstrated that reproduction and lipid metabolism are tightly coupled in cycling females [47]. Whether changes in the mRNA levels of Esr1, *Nr1c1* and of *Cd36* in the E2-replaced Ovx mice also resulted from a loss in feed-back regulatory mechanism will await further studies. Collectively, it could be concluded that regulation of glucose metabolism is tightly controlled by estradiol but that lipid metabolism escaped physiological regulatory feedback in E2-treated females. In addition, because ovaries produce progestogens as well as androgens, E2 replacement is not expected to normalize all disorders induced by ovariectomy.

The use of a model of estrogen withdrawal and replacement has allowed the identification of a set of estrogen-regulated genes. We expected these genes to exhibit changes in mRNA levels in response to chronic exposure to a mixture of archetypal endocrine disruptors previously identified as bearing some estrogeno-mimetic activities as well as metabolic disrupting effects [25, 27, 50]. Specifically, the protocol used herein was adapted from the published previous model [25, 26] except that female mice were not exposed to the mixture of pollutants from fetal life onwards but continuously from week 5 to week 20 through diet. As reviewed previously [7, 51, 52], the mixture of pollutants was designed to question the metabolic health consequences of a multi-exposure scenario to various pollutants at low dosage to approach a real life situation. Specifically, the mixture was made of shortly metabolized (BPA, DEHP) and persistent pollutants (TCDD, PCB153) contaminating food either through bioaccumulation along the food chain (TCDD, PCB153) or leaching from packaging (BPA, DEHP), activating a wide range of signaling molecules, not to mention the many cross-talks occurring between them and triggering estrogeno-mimetic and anti-androgen activities among others [4, 6, 10]. Pollutants constituent parts of the mixture were also chosen because of high concern for links with metabolic diseases in epidemiological and experimental studies [4, 7, 53-55]. Interestingly, we herein observed modest but significant effects in the set-up model of Ovx and E2 replacement in response to the mixture of pollutants. Phenotypically, and in agreement with our previous studies [25, 27, 50], the mixture did not impact body weight. No changes were observed in glucose tolerance or insulin resistance in the mice exposed compared to those not exposed to the pollutant mixture. Nonetheless, adiponectin levels were found to be lower in E2-replaced and pollutant-exposed mice than in E2-replaced and non-exposed females. This finding is indicative of an adverse

hormonal and metabolic effect triggered by pollutant exposure since adiponectin is an adipokine with positive metabolic properties [56]. In addition, TG accumulation in liver of HFp Ovx mice was trending upward compared to non-exposed Ovx mice. Some genes involved in lipid metabolism in the liver and which mRNA levels were not modified by ovariectomy, were found impacted in response to the mixture of pollutants in Ovx mice (i.e., HFp Ovx *versus* HF0 Ovx mice). All these findings indicated that the mixture of pollutants had some metabolic impact but did not exert estrogeno-mimetic activities at least on the set of hepatic genes studied. These data do not fully reproduce previous findings in which the same mixture of pollutants was found to enhance *Esr1* gene expression in the liver of ovariectomized females and alleviate glucose intolerance [28]. One possible explanation resides in the timing of exposure to the mixture encompassing gestation and lactation in the previous protocol [28] but not in the present study. Indeed, the maternal period has been found to be a highly vulnerable period [57, 58]. For example, it was demonstrated that hepatic metabolic gene expression in adult mice including *Esr1* was strongly impacted in mice exposed *in utero* to BPA as compared to control mice [59]. In addition, the vulnerability of the fetal period towards exposure to the presently used mixture of pollutants has been evidenced in male mice [50].

Importantly, we observed that the response to the mixture of pollutants was highly tissue-dependent extending our previous data [26, 50]. While we did not identify estrogeno-mimetic activities of the pollutant mixture in the liver, the situation was clearly distinct in SAT. Indeed, the estrogen receptors *Esr1* and *Esr2* were found regulated the same way by either the pollutant mixture or E2 supplementation. Conversely, the mixture of pollutants tended to oppose E2 effects in VAT with an up-regulation of *Esr2* and *Il12a* mRNA abundance in E2-replaced mice. The meaning of these distinct effects depending on fat depots, remains to be investigated but may be linked to the distinct functions of the fat depots regarding adipogenesis and inflammation [41, 42]. In addition, it should be reminded that the dosage of the mixture was based on the tolerable daily intake (TDI) doses defined empirically by risk assessment agencies, e.g., the European Food Safety Authority (EFSA) or the U.S. Food and Drug administration (FDA) [60], thus not expected individually to generate a metabolic effect. Therefore, the herein demonstration that several genes were impacted (at least at the mRNA level) by a mixture of low-dose pollutants together with previous data on the adverse metabolic effects of low-dosed mixture [52], emphasizes that current legislation on chemical risk assessment may underestimate the risk and should be updated.

In summary, analysis of female mice in conditions of withdrawal of estrogen, E2 replacement or exposure to a mixture of pollutants with reported estrogeno-mimetic activities, extended knowledge on the estrogenic regulation of glucose and lipid metabolism in the liver and of adipogenesis and inflammatory markers in the fat depots. Importantly, this model highlighted that the disrupting effect of the mixture of low-dosed pollutants which did not affect body weight, glycaemia, plasma insulin and lipidemia was different in the liver and adipose tissues. Noticeably, alterations concerned adiponectin plasma levels, estrogen receptors in the adipose tissue and lipid metabolism in the liver. The present findings may have important implications for the understanding of the estrogen-dependent metabolic alterations with regards to situations of loss of estrogens as observed with menopause, especially if considering the worldwide context of exposure to chemicals.

References

[1] WHO. Obesity and overweight. 2018;http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/.
[2] Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. Int J Obes (Lond). 2008;32:1431-7.
[3] Stefanska A, Bergmann K, Sypniewska G. Metabolic Syndrome and Menopause: Pathophysiology, Clinical and Diagnostic Significance. Advances in clinical chemistry. 2015;72:1-75.
[4] Casals-Casas C, Desvergne B. Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. Annual review of physiology. 2011;73:135-62.
[5] Nadal A, Quesada I, Tuduri E, Nogueiras R, Alonso-Magdalena P. Endocrine-disrupting chemicals and the regulation of energy balance. Nature reviews Endocrinology. 2017;13:536-46.
[6] Thayer KA, Heindel JJ, Bucher JR, Gallo MA. Role of environmental chemicals in diabetes and obesity: a National Toxicology Program workshop review. Environmental health perspectives. 2012;120:779-89.
[7] Le Magueresse-Battistoni B, Labaronne E, Vidal H, Naville D. Endocrine disrupting chemicals in mixture and obesity, diabetes and related metabolic disorders. World J Biol Chem. 2017;8:108-19.
[8] Schafer KS, Kegley SE. Persistent toxic chemicals in the US food supply. Journal of epidemiology and community health. 2002;56:813-7.
[9] Muncke J. Exposure to endocrine disrupting compounds via the food chain: Is packaging a relevant source? The Science of the total environment. 2009;407:4549-59.
[10] Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Jr., Lee DH, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. Endocrine reviews. 2012;33:378-455.
[11] Kortenkamp A. Low dose mixture effects of endocrine disrupters and their implications for regulatory thresholds in chemical risk assessment. Current opinion in pharmacology. 2014;19:105-11.
[12] Svingen T, Vinggaard AM. The risk of chemical cocktail effects and how to deal with the issue. Journal of epidemiology and community health. 2016;70:322-3.
[13] Le Magueresse-Battistoni B, Vidal H, Naville D. Sex-specific metabolic alterations induced by environmental pollutants. Current Opinion in Toxicology. 2018;8 1-7 http://www.hal.inserm.fr/inserm-01743795.
[14] Zoeller RT, Bergman A, Becher G, Bjerregaard P, Bornman R, Brandt I, et al. A path forward in the debate over health impacts of endocrine disrupting chemicals. Environ Health. 2014;13:118.
[15] Gauthier MS, Rabasa-Lhoret R, Prud'homme D, Karelis AD, Geng D, van Bavel B, et al. The metabolically healthy but obese phenotype is associated with lower plasma levels of persistent organic pollutants as compared to the metabolically abnormal obese phenotype. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2014;99:E1061-6.
[16] Mauvais-Jarvis F, Clegg DJ, Hevener AL. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. Endocrine reviews. 2013;34:309-38.
[17] Riant E, Waget A, Cogo H, Arnal JF, Burcelin R, Gourdy P. Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. Endocrinology. 2009;150:2109-17.
[18] Zhu L, Brown WC, Cai Q, Krust A, Chambon P, McGuinness OP, et al. Estrogen treatment after ovariectomy protects against fatty liver and may improve pathway-selective insulin resistance. Diabetes. 2013;62:424-34.
[19] Barros RP, Machado UF, Gustafsson JA. Estrogen receptors: new players in diabetes mellitus. Trends in molecular medicine. 2006;12:425-31.
[20] Sharma G, Prossnitz ER. G-Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER) and Sex-Specific Metabolic Homeostasis. Advances in experimental medicine and biology. 2017;1043:427-53.
[21] Maggi A, Della Torre S. Sex, metabolism and health. Molecular metabolism. 2018;15:3-7.
[22] Matthews J, Gustafsson JA. Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. Nuclear receptor signaling. 2006;4:e016.

[23] Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. Endocrine reviews. 2009;30:293-342.
[24] Swanson HI, Wada T, Xie W, Renga B, Zampella A, Distrutti E, et al. Role of nuclear receptors in lipid dysfunction and obesity-related diseases. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals. 2013;41:1-11.
[25] Naville D, Pinteur C, Vega N, Menade Y, Vigier M, Le Bourdais A, et al. Low-dose food contaminants trigger sex-specific, hepatic metabolic changes in the progeny of obese mice. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2013;27:3860-70.
[26] Labaronne E, Pinteur C, Vega N, Pesenti S, Julien B, Meugnier-Fouilloux E, et al. Low-dose pollutant mixture triggers metabolic disturbances in female mice leading to common and specific features as compared to a high-fat diet. The Journal of nutritional biochemistry. 2017;45:83-93.
[27] Naville D, Labaronne E, Vega N, Pinteur C, Canet-Soulas E, Vidal H, et al. Metabolic outcome of female mice exposed to a mixture of low-dose pollutants in a diet-induced obesity model. PloS one. 2015;10:e0124015.
[28] Julien B, Pinteur C, Vega N, Labaronne E, Vidal H, Naville D, et al. Evidence for estrogeno-mimetic effects of a mixture of low-dose pollutants in a model of ovariectomized mice. Environmental toxicology and pharmacology. 2018;57:34-40.
[29] Raskin K, de Gendt K, Duittoz A, Liere P, Verhoeven G, Tronche F, et al. Conditional inactivation of androgen receptor gene in the nervous system: effects on male behavioral and neuroendocrine responses. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2009;29:4461-70.
[30] Naville D, Rebourcet D, Chauvin MA, Vega N, Jalabert A, Vigier M, et al. Direct and indirect impact of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on adult mouse Leydig cells: an in vitro study. Toxicology letters. 2011;207:251-7.
[31] Bryzgalova G, Lundholm L, Portwood N, Gustafsson JA, Khan A, Efendic S, et al. Mechanisms of antidiabetogenic and body weight-lowering effects of estrogen in high-fat diet-fed mice. American journal of physiology Endocrinology and metabolism. 2008;295:E904-12.
[32] Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism. 2015;29:557-68.
[33] Kershaw EE, Schupp M, Guan HP, Gardner NP, Lazar MA, Flier JS. PPARgamma regulates adipose triglyceride lipase in adipocytes in vitro and in vivo. American journal of physiology Endocrinology and metabolism. 2007;293:E1736-45.
[34] Gao H, Falt S, Sandelin A, Gustafsson JA, Dahlman-Wright K. Genome-wide identification of estrogen receptor alpha-binding sites in mouse liver. Molecular endocrinology (Baltimore, Md. 2008;22:10-22.
[35] Winzell MS, Coghlan M, Leighton B, Frangioudakis G, Smith DM, Storlien LH, et al. Chronic glucokinase activation reduces glycaemia and improves glucose tolerance in high-fat diet fed mice. European journal of pharmacology. 2011;663:80-6.
[36] Wagner M, Zollner G, Trauner M. Nuclear receptors in liver disease. Hepatology (Baltimore, Md. 2011;53:1023-34.
[37] Aleksunes LM, Klaassen CD. Coordinated regulation of hepatic phase I and II drug-metabolizing genes and transporters using AhR-, CAR-, PXR-, PPARalpha-, and Nrf2-null mice. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals. 2012;40:1366-79.
[38] Camporez JP, Jornayvaz FR, Lee HY, Kanda S, Guigni BA, Kahn M, et al. Cellular mechanism by which estradiol protects female ovariectomized mice from high-fat diet-induced hepatic and muscle insulin resistance. Endocrinology. 2013;154:1021-8.
[39] Lavoie JM. Dynamics of hepatic and intestinal cholesterol and bile acid pathways: The impact of the animal model of estrogen deficiency and exercise training. World journal of hepatology. 2016;8:961-75.

[40] Mauvais-Jarvis F, Manson JE, Stevenson JC, Fonseca VA. Menopausal Hormone Therapy and Type 2 Diabetes Prevention: Evidence, Mechanisms, and Clinical Implications. Endocrine reviews. 2017;38:173-88.
[41] Maury E, Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. Molecular and cellular endocrinology. 2010;314:1-16.
[42] Frank AP, de Souza Santos R, Palmer BF, Clegg DJ. Determinants of body fat distribution in humans may provide insight about obesity-related health risks. Journal of lipid research. 2018.
[43] Foryst-Ludwig A, Kintscher U. Metabolic impact of estrogen signalling through ERalpha and ERbeta. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology. 2010;122:74-81.
[44] Wang A, Luo J, Moore W, Alkhalidy H, Wu L, Zhang J, et al. GPR30 regulates diet-induced adiposity in female mice and adipogenesis in vitro. Scientific reports. 2016;6:34302.
[45] Fagman JB, Wilhelmson AS, Motta BM, Pirazzi C, Alexanderson C, De Gendt K, et al. The androgen receptor confers protection against diet-induced atherosclerosis, obesity, and dyslipidemia in female mice. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2015;29:1540-50.
[46] Davis KE, Neinast MD, Sun K, Skiles WM, Bills JD, Zehr JA, et al. The sexually dimorphic role of adipose and adipocyte estrogen receptors in modulating adipose tissue expansion, inflammation, and fibrosis. Molecular metabolism. 2013;2:227-42.
[47] Villa A, Della Torre S, Stell A, Cook J, Brown M, Maggi A. Tetradian oscillation of estrogen receptor alpha is necessary to prevent liver lipid deposition. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012;109:11806-11.
[48] Cave MC, Clair HB, Hardesty JE, Falkner KC, Feng W, Clark BJ, et al. Nuclear receptors and nonalcoholic fatty liver disease. Biochimica et biophysica acta. 2016;1859:1083-99.
[49] Wang HH, Afdhal NH, Wang DQ. Overexpression of estrogen receptor alpha increases hepatic cholesterogenesis, leading to biliary hypersecretion in mice. Journal of lipid research. 2006;47:778-86.
[50] Naville D, Gaillard G, Julien B, Vega N, Pinteur C, Chanon S, et al. Chronic exposure to a pollutant mixture at low doses led to tissue-specific metabolic alterations in male mice fed standard and high-fat high-sucrose diet. Chemosphere. 2019;220:1187-99.
[51] Le Magueresse-Battistoni B, Vidal H, Naville D. Lifelong consumption of low-dosed food pollutants and metabolic health. Journal of epidemiology and community health. 2015;69:512-5.
[52] Le Magueresse-Battistoni B, Vidal H, Naville D. Environmental Pollutants and Metabolic Disorders: The Multi-Exposure Scenario of Life. Frontiers in endocrinology. 2018;9:582.
[53] Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, Flaws JA, Nadal A, Prins GS, et al. EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. Endocrine reviews. 2015;36:E1-E150.
[54] Alonso-Magdalena P, Quesada I, Nadal A. Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. Nature reviews Endocrinology. 2011;7:346-53.
[55] Heindel JJ, Blumberg B, Cave M, Machtinger R, Mantovani A, Mendez MA, et al. Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. Reprod Toxicol. 2017;68:3-33.
[56] Turer AT, Scherer PE. Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications. Diabetologia. 2012;55:2319-26.
[57] Barker DJ, Eriksson JG, Forsen T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. International journal of epidemiology. 2002;31:1235-9.
[58] Barouki R, Gluckman PD, Grandjean P, Hanson M, Heindel JJ. Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. Environ Health. 2012;11:42.
[59] Ilagan Y, Mamillapalli R, Goetz LG, Kayani J, Taylor HS. Bisphenol-A exposure in utero programs a sexually dimorphic estrogenic state of hepatic metabolic gene expression. Reprod Toxicol. 2017;71:84-94.
[60] Dorne JL. Metabolism, variability and risk assessment. Toxicology. 2010;268:156-64.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge Emmanuelle Loizon for technical help with PCR primers, Patrick Manas for animal care, Véronique Coxam and Patrice Lebecque for ovariectomy training and Sakina Mhaouty-Kodja for providing us with the E2 pellets. The authors wish to thank Dr Alexandrine Derrien-Colemyn for critically reading the manuscript.

Conflict of interest

The authors have declared that no competing interests exist.

Legends

Figure 1: **(A)** Body weight and weight of visceral and subcutaneous adipose tissues (VAT and SAT, respectively) measured at the end of the protocols (after 6 h of fasting). **(B)** Biochemical parameters**:** Blood glucose, plasma insulin and HOMA-IR. **(C)** Glucose Tolerance test performed after 13 wks of diet and corresponding AUC. **(D)** Measurement of whole body composition by NMR and of the adipocyte area.

Values are means ± SEM with n=7-8. ***P<0.001; ** P<0.01; *P<0.05 (one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test). For the adipocyte area, values are means ± SEM with n=3. A significant overall effect was obtained using a Two-way ANOVA followed by the Bonferroni test. Standard: standard diet; HF0: pollutant-free high-fat high-sucrose diet; Sham: sham-operated mice; Ovx: ovariectomized mice; Ovx+E2: ovariectomized mice with E2 replacement.

Figure 2: Effect of ovariectomy alone (Ovx) or with 17β-estradiol (E2) supplementation (Ovx+E2) on the expression of genes encoding the estrogen receptors ERα, ERβ, GPR30 and the androgen receptor AR in subcutaneous **(A)** and visceral **(B)** adipose tissues (SAT and VAT, respectively). Values are means ± SEM with n=6-8. ***P<0.001; ** P<0.01; *P<0.05. Sham: sham -operated mice.

Figure 3: Effect of ovariectomy alone (Ovx) or with 17β-estradiol (E2) supplementation (Ovx+E2) on the expression of genes related to adipogenesis and lipogenesis **(A, A')**, lipolysis **(B, B')** in subcutaneous (SAT, **A, B**) and visceral (VAT **A', B'**) adipose tissues. Values are means ± SEM with n=6-8. ***P<0.001; ** P<0.01; *P<0.0; Sham: sham-operated mice.

Figure 4: Effect of ovariectomy alone (Ovx) or with 17β-estradiol (E2) supplementation (Ovx+E2) on the expression of genes encoding inflammatory markers in subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) adipose tissues.Values are means ± SEM with n=6-8. ***P<0.001; ** P<0.01; *P<0.0. Sham: sham-operated mice.

Figure 5: Effect of ovariectomy alone (Ovx) or with 17β-estradiol (E2) supplementation (Ovx+E2) on the expression of genes encoding the nuclear estrogen receptor ERα **(A)**, genes related to glucose metabolism **(B)**, fatty acid metabolism **(C)**, triglyceride metabolism **(D)**, cholesterol metabolism **(E)** in liver. Values are means ± SEM with n=6-8. ***P<0.001; ** P<0.01; *P<0.05. Sham: sham-operated mice.

Figure 6: Effect of the the mixture of pollutants on the expression of genes expressed in subcutaneous (SAT, **A)**, visceral (VAT**, B)** adipose tissues, or liver **(C)**. Values (expressed as fold-change relative to the HF0 group) are means ± SEM with n=6-8. ***P<0.001; ** P<0.01; *P<0.05. Ovx: ovariectomized mice; Ovx+E2: ovariectomized mice with E2 replacement. HF0: pollutant-free high-fat high-sucrose diet; HFp: high-fat high-sucrose diet containing the mixture of pollutants.

Table 1: Biochemical parameters

	HF0 sham	HF0 Ovx	HF0 Ovx + E2	HFp Ovx	HFp Ovx + E2
Plasma					
Total cholesterol (mg/mL)	1.54 ± 0.06	1.72 ± 0.08	1.32 ± 0.09$^{\beta}$	1.84 ± 0.08	1.16 ± 0.17$^{\beta}$
Cholesteryl esters (mg/mL)	1.17 ± 0.04	1.31 ± 0.06	1.02 ± 0.07$^{\beta}$	1.38 ± 0.07	0.87 ± 0.12$^{\beta}$
Triglycerides (mM)	0.70 ± 0.04	0.63 ± 0.03	0.62 ± 0.10	0.73 ± 0.06	0.46 ± 0.05$^{\beta}$
Free Fatty Acids (µM)	325 ± 36	500 ± 43$^{\alpha}$	352 ± 44$^{\beta}$	468 ± 50	281 ± 39$^{\beta}$
Leptin (ng/mL)	23.2 ± 3.8	32.3 ± 4.5	11.4 ± 1.2$^{\alpha,\beta}$	41.3 ± 4.0	12.1 ± 1.9$^{\beta}$
Adiponectin (µg/mL)	14.7 ± 0.4	15.1 ± 0.4	12.6 ± 0.6$^{\alpha,\beta}$	15.0 ± 0.8	9.82 ± 0.63$^{\beta,\gamma}$
Liver					
Cholesterol (µg/mg)	3.19 ± 0.13	3.59 ± 0.40	3.70 ± 0.21	3.67 ± 0.15	3.27 ± 0.16
Triglycerides (nmol/mg)	18.6 ± 3.6	25.8 ± 4.8	15.6 ± 1.4	38.6 ± 8.1	14.8 ± 1.7$^{\beta}$

Values are means ± SEM with n=6-8. (**α**): significant effect *vs* HF0 sham; (**β**) significant E2 effect; (**γ**) significant pollutant effect (using a one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test).

HF0: pollutant-free high-fat high-sucrose diet; HFp: high-fat high-sucrose diet containing the mixture of pollutants; Sham: sham-operated mice; Ovx: ovariectomized mice; Ovx+E2: ovariectomized mice with E2 replacement.

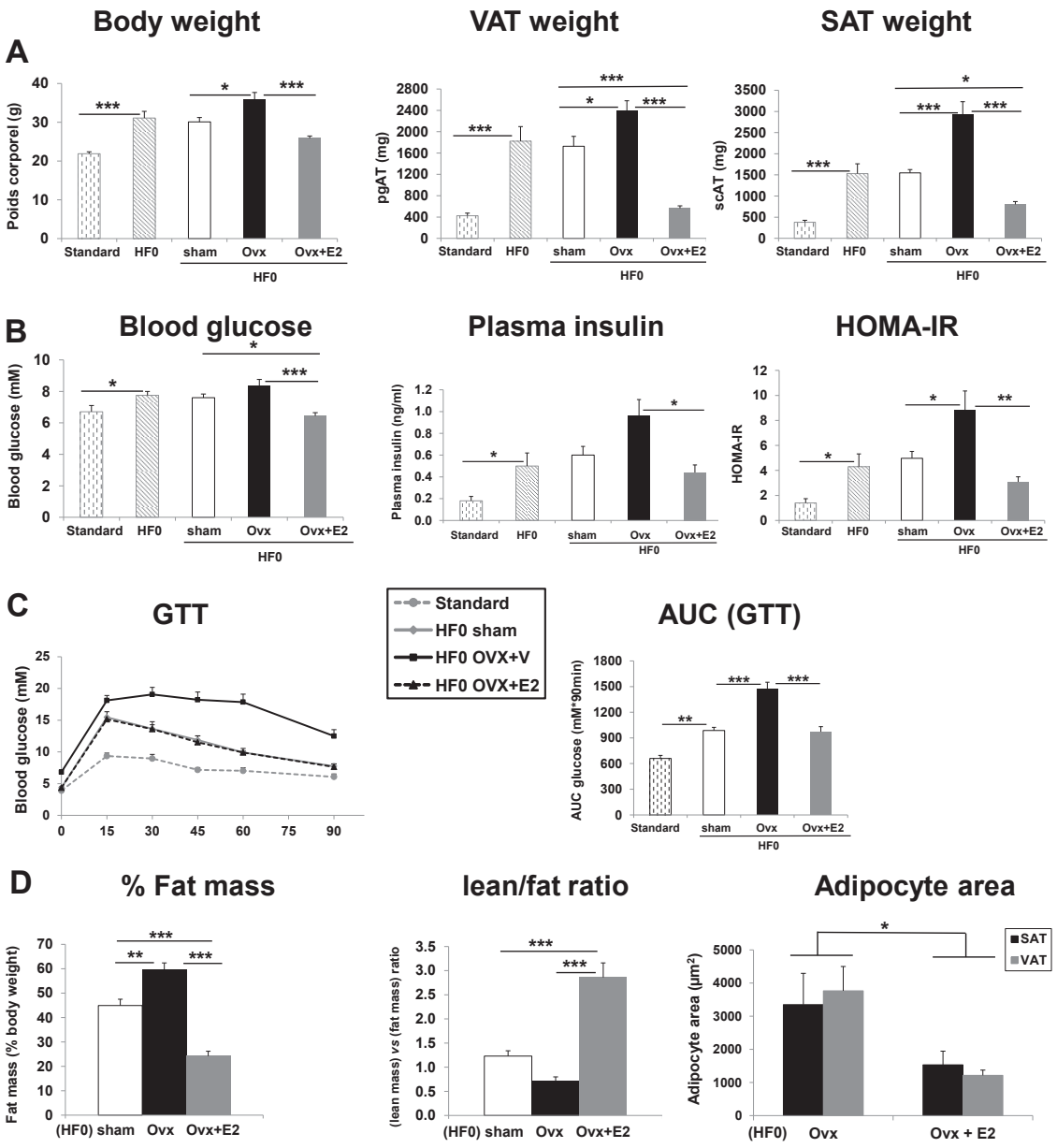

A
Body weight
Poids corporel (g)
Standard
HF0
sham
Ovx
Ovx+E2
HF0
VAT weight
pgAT (mg)
SAT weight
scAT (mg)
B
Blood glucose
Blood glucose (mM)
Plasma insulin
Plasma insulin (ng/ml)
HOMA-IR
C
GTT
Blood glucose (mM)
Standard
HF0 sham
HF0 OVX+V
HF0 OVX+E2
AUC (GTT)
AUC glucose (mM*90min)
D
% Fat mass
Fat mass (% body weight)
(HF0) sham
Ovx
Ovx+E2
lean/fat ratio
(lean mass) vs (fat mass) ratio
Adipocyte area
Adipocyte area (µm²)
SAT
VAT
(HF0)
Ovx
Ovx + E2

Figure 1

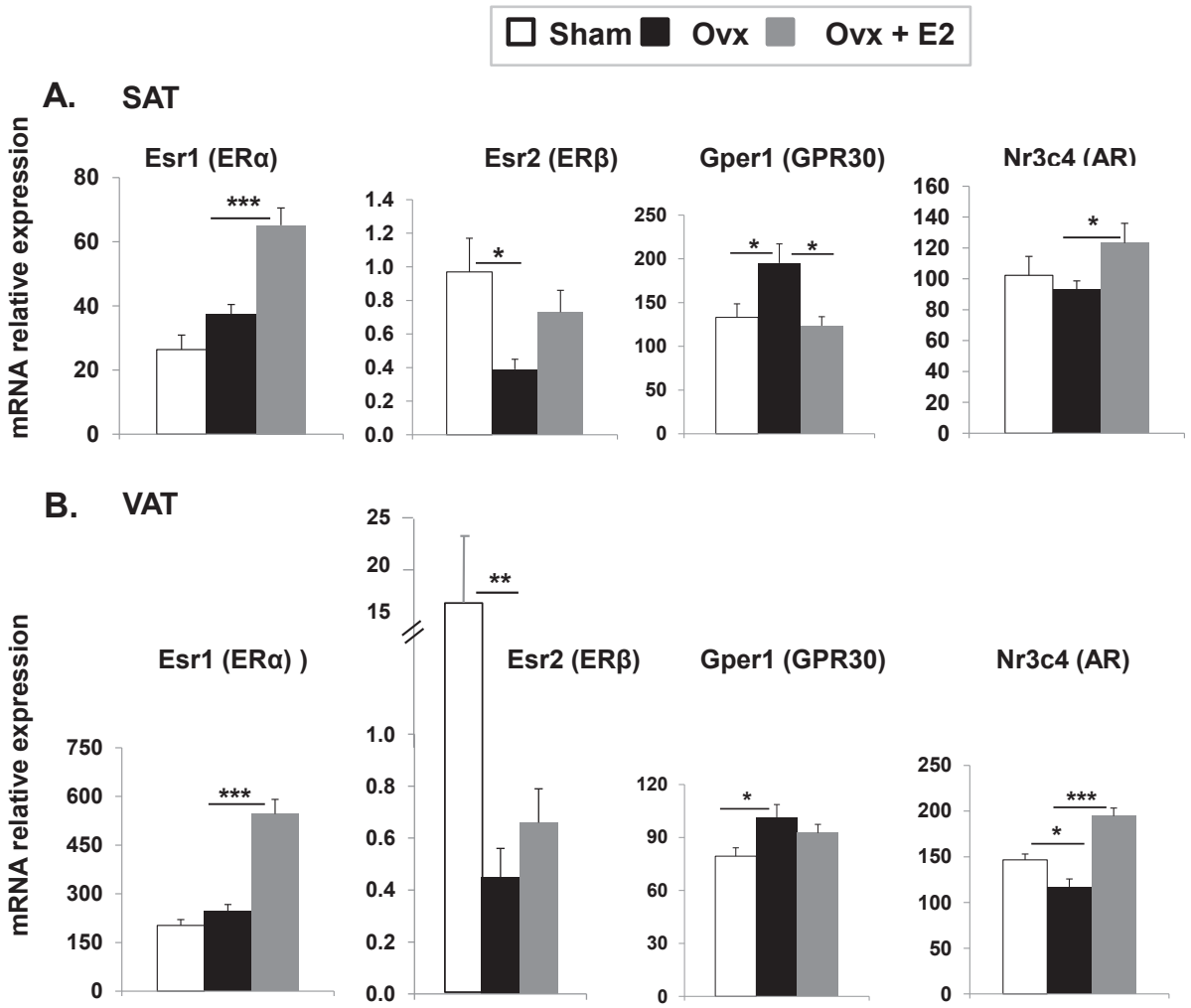

Sham
Ovx
Ovx + E2
A. SAT
mRNA relative expression
Esr1 (ERα)
Esr2 (ERβ)
Gper1 (GPR30)
Nr3c4 (AR)
B. VAT
mRNA relative expression
Esr1 (ERα))
Esr2 (ERβ)
Gper1 (GPR30)
Nr3c4 (AR)

Figure 2

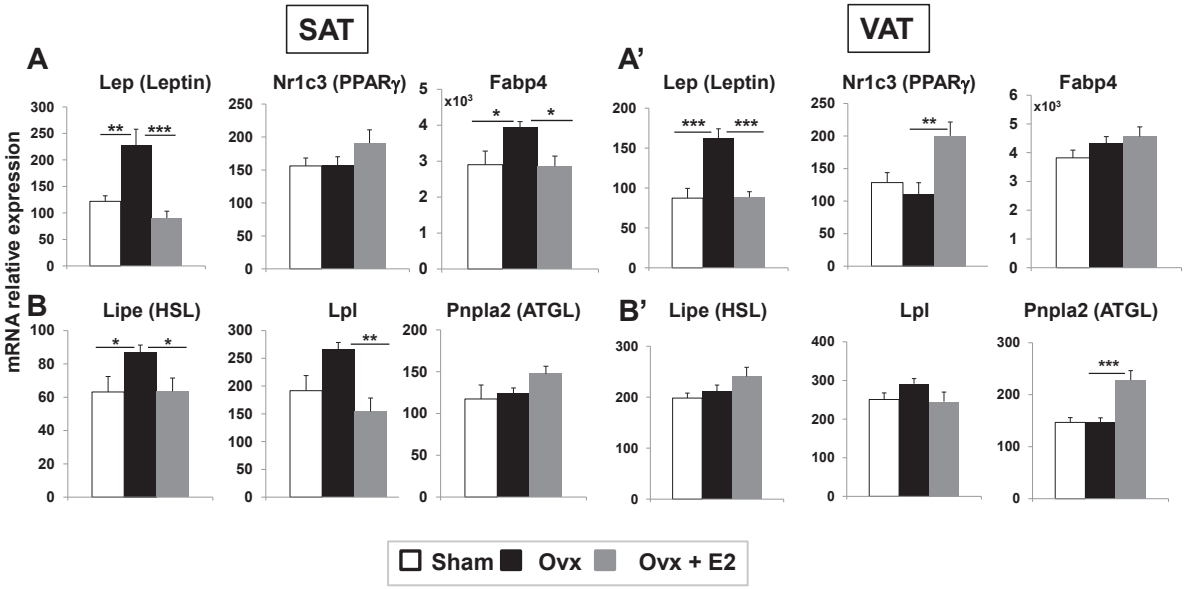

SAT
VAT
A
A'
B
B'
Lep (Leptin)
Nr1c3 (PPARγ)
Fabp4
Lipe (HSL)
Lpl
Pnpla2 (ATGL)
mRNA relative expression
x10³
Sham
Ovx
Ovx + E2

Figure 3

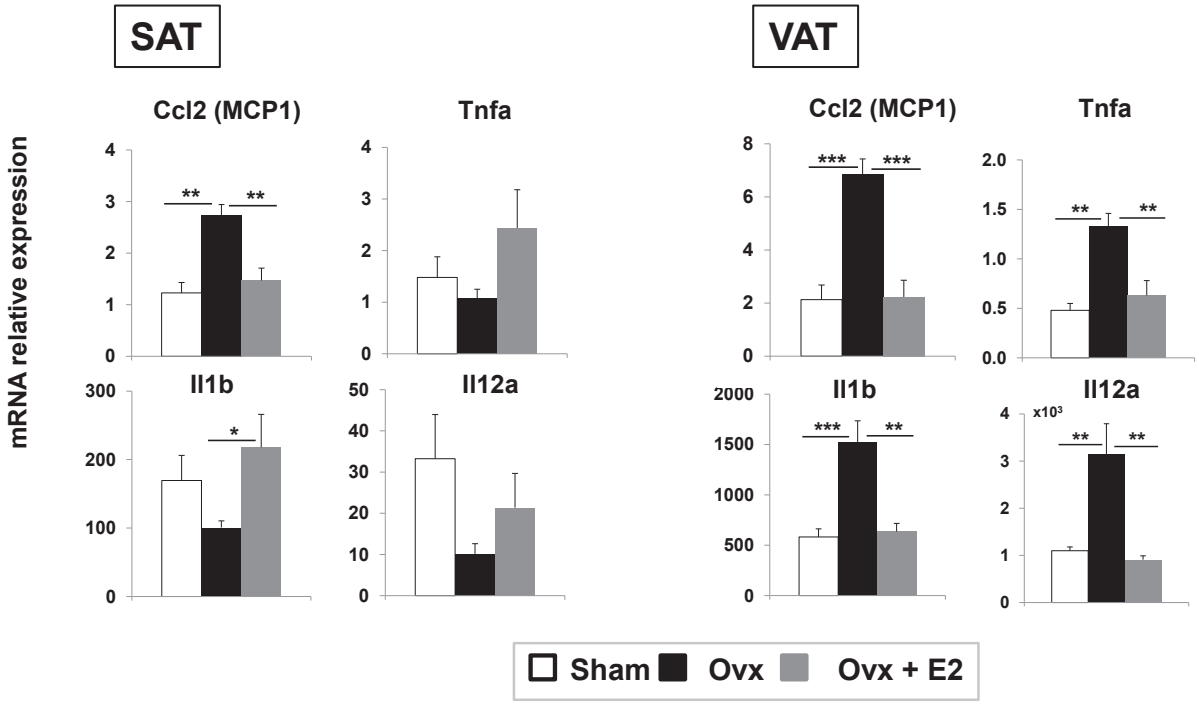

SAT
VAT
Ccl2 (MCP1)
Tnfa
Il1b
Il12a
mRNA relative expression
x10³
Sham
Ovx
Ovx + E2

Figure 4

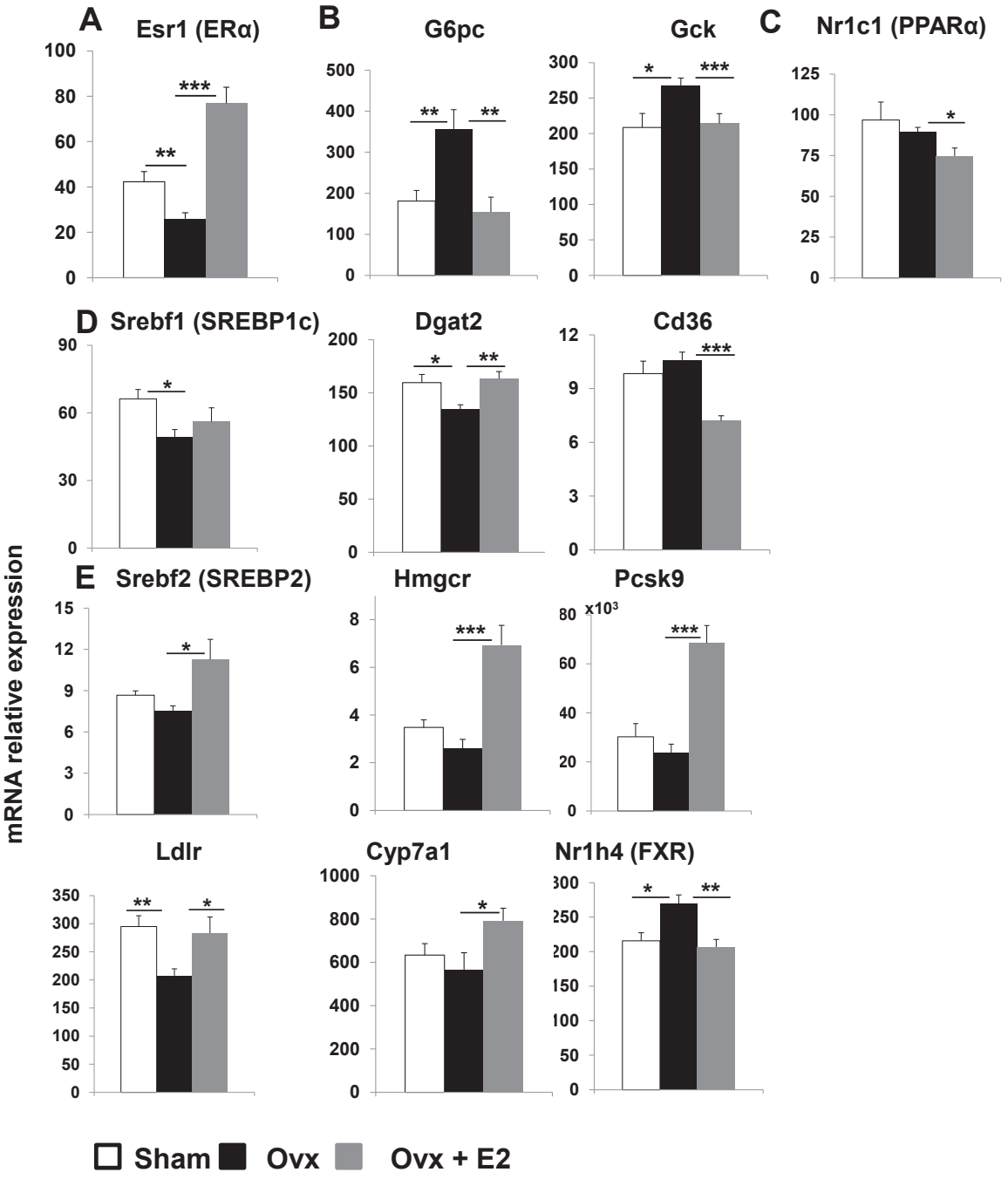

A
Esr1 (ERα)
B
G6pc
Gck
C
Nr1c1 (PPARα)
D
Srebf1 (SREBP1c)
Dgat2
Cd36
E
Srebf2 (SREBP2)
Hmgcr
Pcsk9
x10³
Ldlr
Cyp7a1
Nr1h4 (FXR)
mRNA relative expression
Sham
Ovx
Ovx + E2

Figure 5

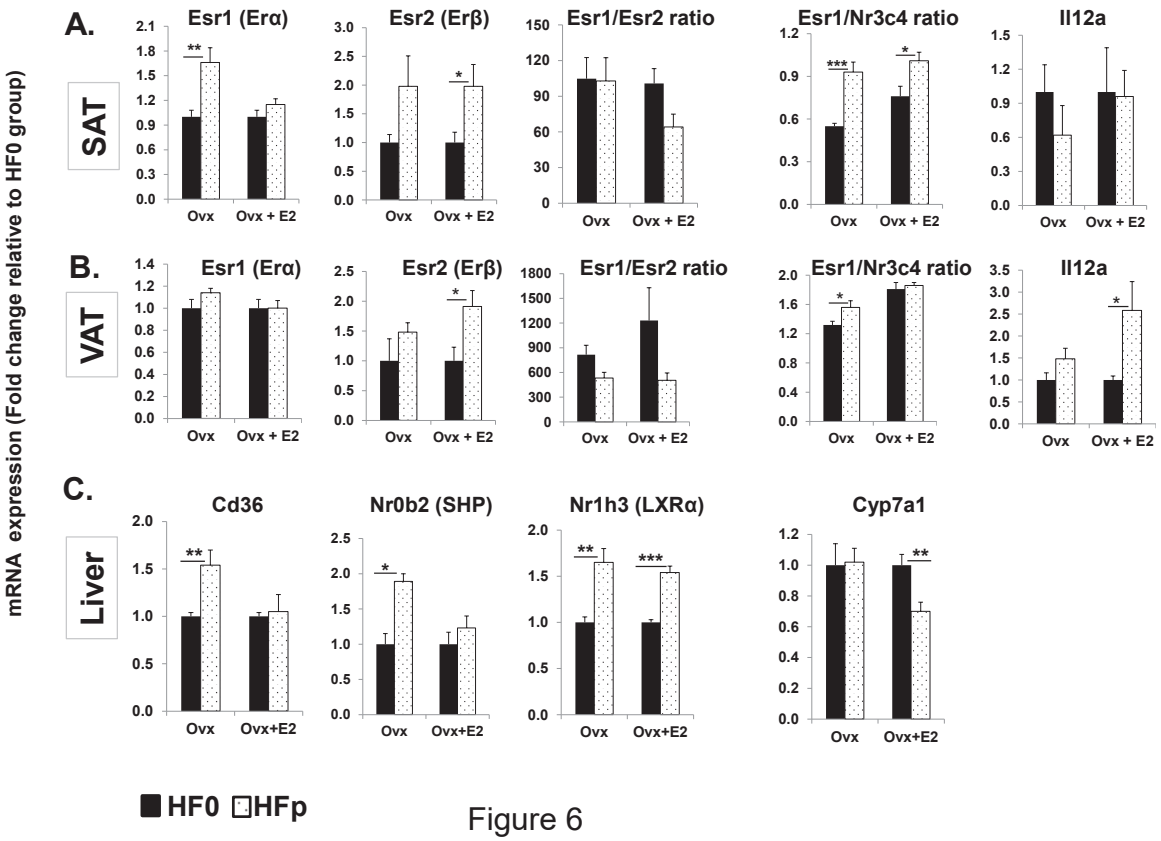
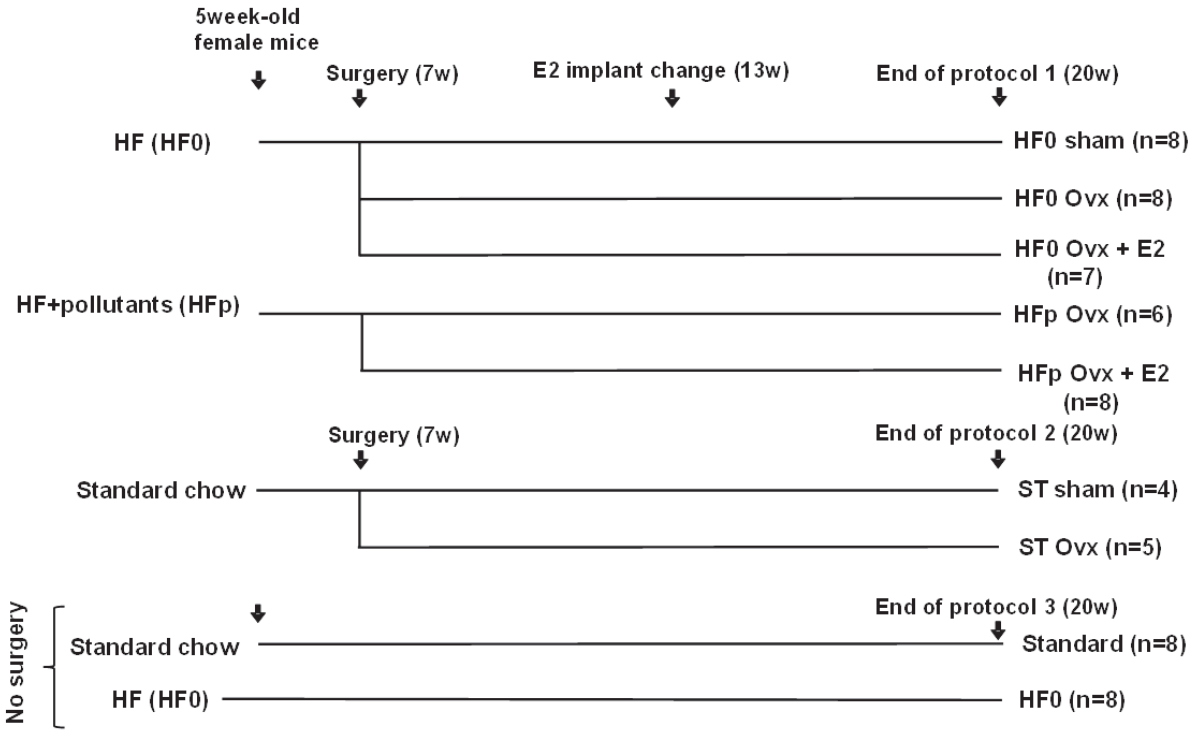
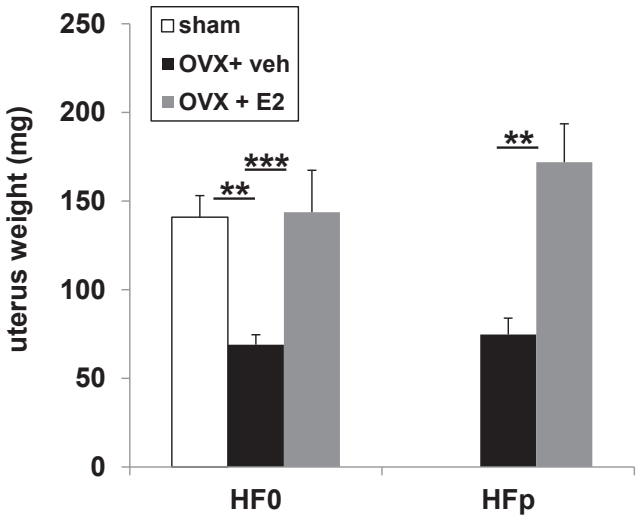

mRNA expression (Fold change relative to HF0 group)
A.
SAT
Esr1 (Erα)
Esr2 (Erβ)
Esr1/Esr2 ratio
Esr1/Nr3c4 ratio
Il12a
Ovx
Ovx + E2
B.
VAT
C.
Liver
Cd36
Nr0b2 (SHP)
Nr1h3 (LXRα)
Cyp7a1
Ovx+E2
HF0
HFp

Figure 6

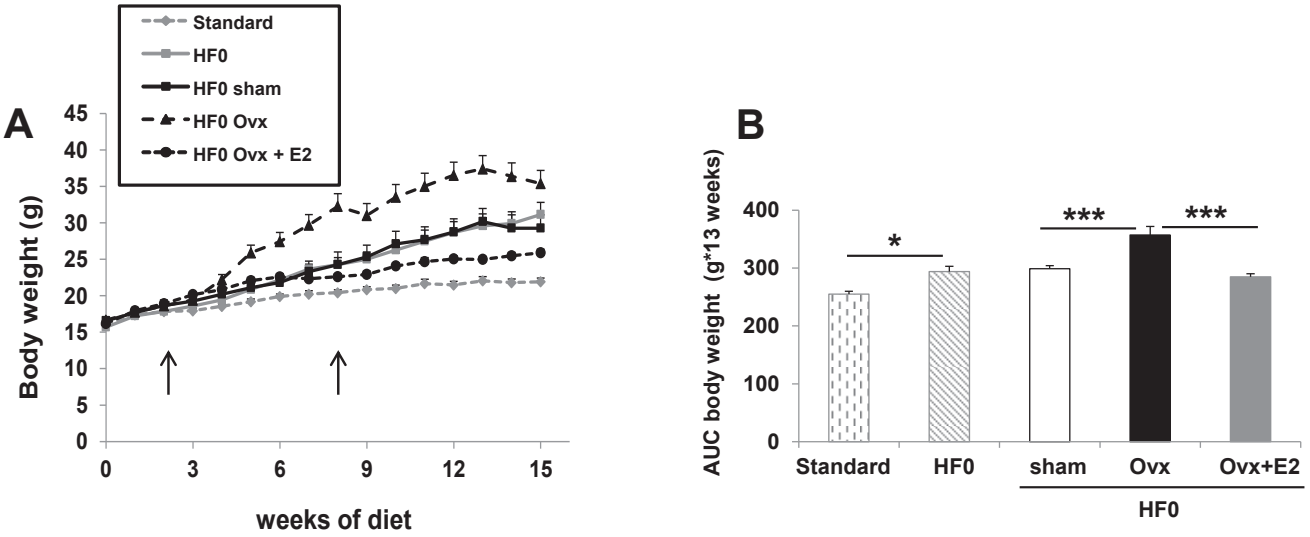
Supplemental Figures



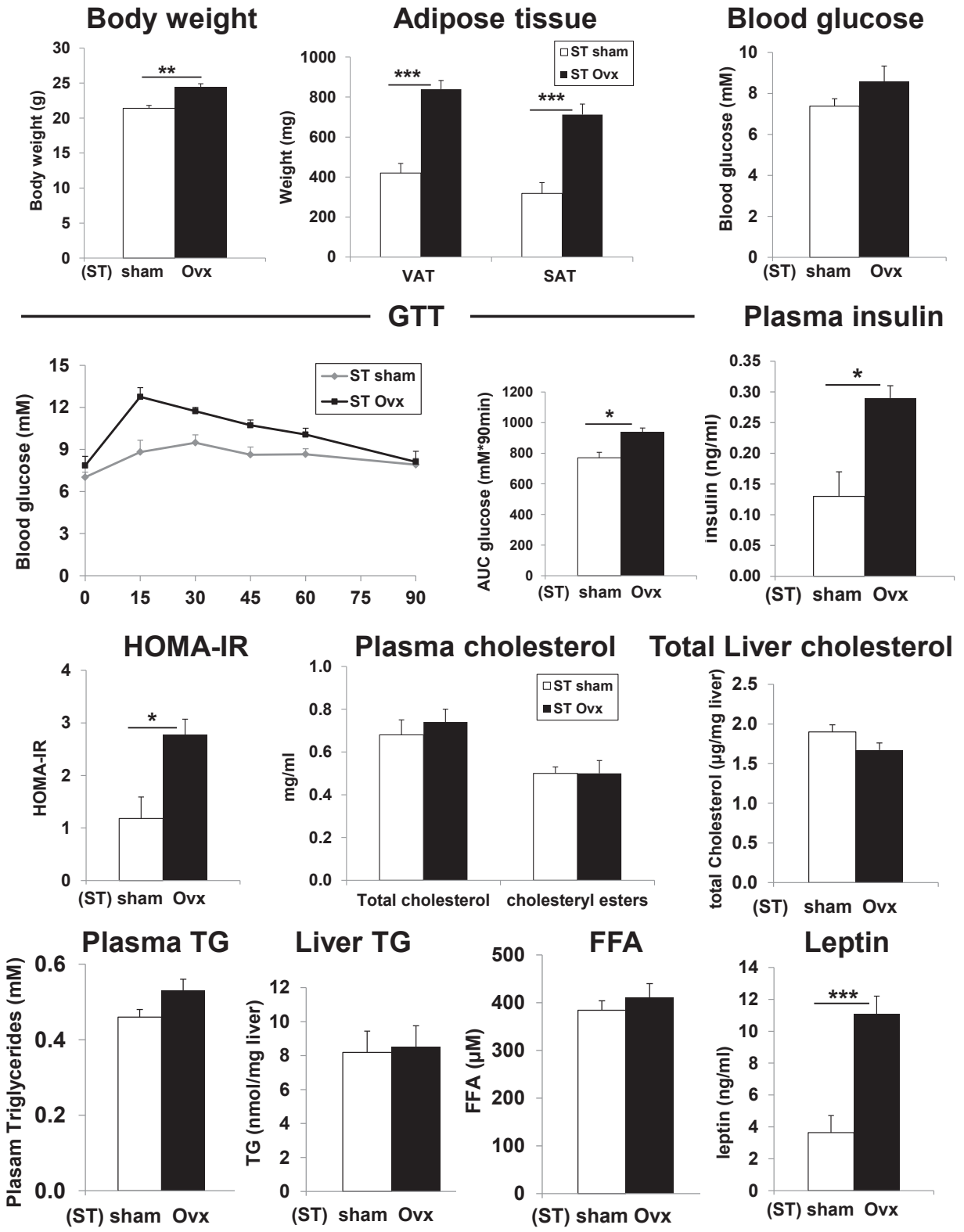
Supplemental Figure 1: Experimental protocols. ST: standard chow diet; HF: high-fat high-sucrose diet; HF0: pollutant-free high-fat high-sucrose diet; HFp: high-fat high-sucrose diet containing the mixture of pollutants. Sham: sham-operated mice; Ovx: ovariectomized mice; Ovx+E2: ovariectomized mice with E2 replacement.



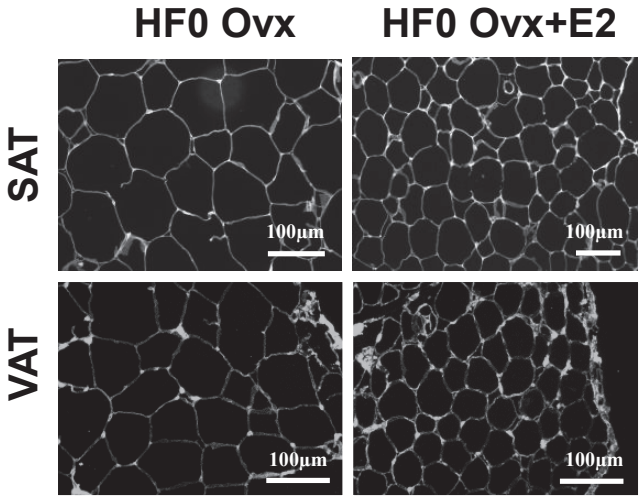
Supplemental Figure 2: Uterus was weighed at the end of the protocol to validate ovariectomy and delivery of E2 after surgery. HF0: pollutant-free high-fat high-sucrose diet; HFp: high-fat high-sucrose diet containing the mixture of pollutants. Sham: sham-operated mice; Ovx: ovariectomized mice; Ovx+E2: ovariectomized mice with E2 replacement.Values are mean ± SEM (n=6-8). **p<0.01, ***p<0.001 (using a one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test).



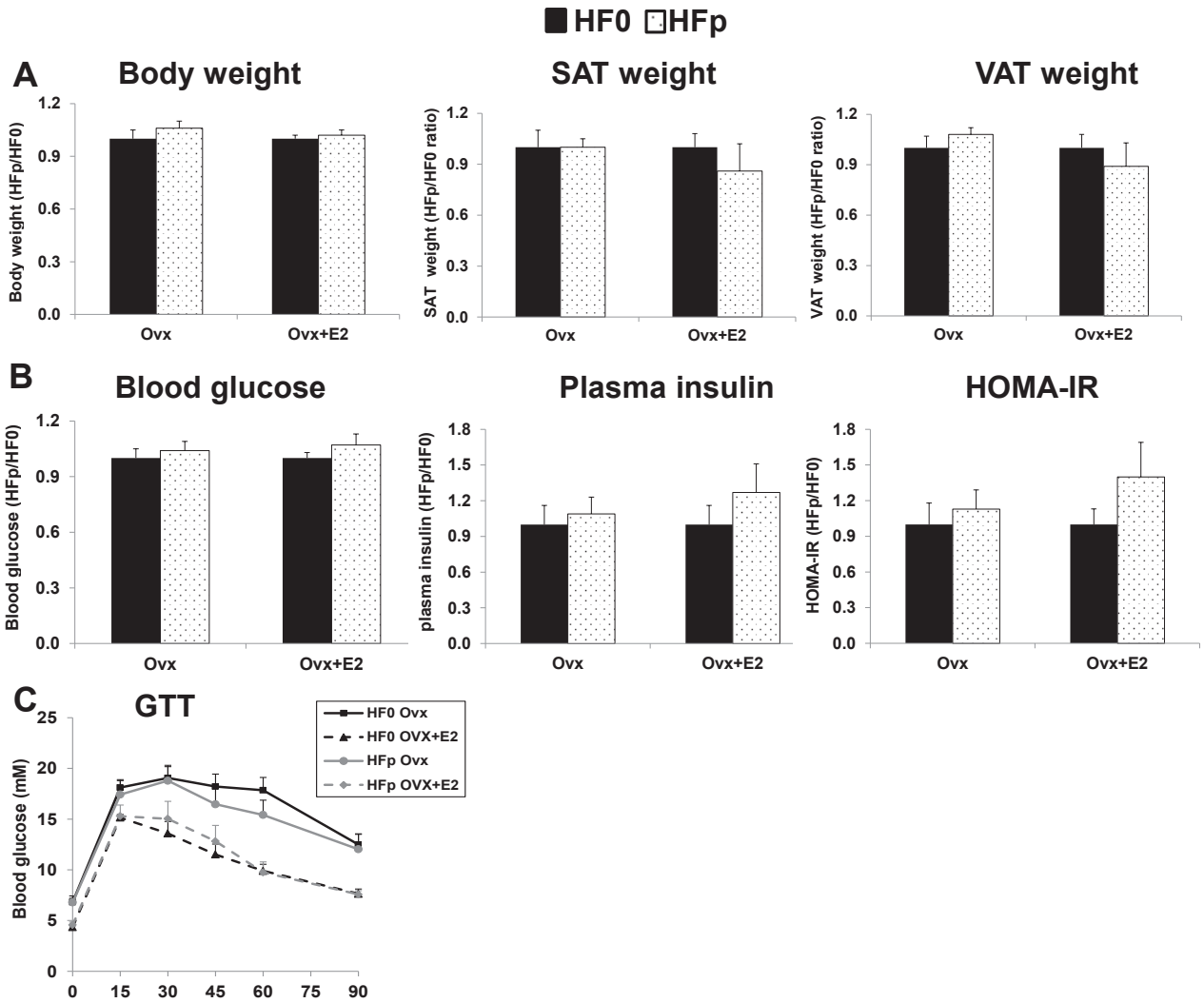
Supplemental Figure 3: (A) Body weight curves along the 15 weeks of diet. Arrows indicate weeks when mice (sham, Ovx and Ovx+E2) were submitted to anesthesia (ovariectomy and implant after 2 weeks of diet and implant replacement at 8 weeks). Standard: standard chow diet; HF0: pollutant-free high-fat high-sucrose diet; HFp: high-fat high-sucrose diet containing the mixture of pollutants. Sham: sham-operated mice; Ovx: ovariectomized mice; Ovx+E2: ovariectomized mice with E2 replacement. Values are mean ± SEM (n=8). *p<0.05; **p<0.01, ***p<0.001.



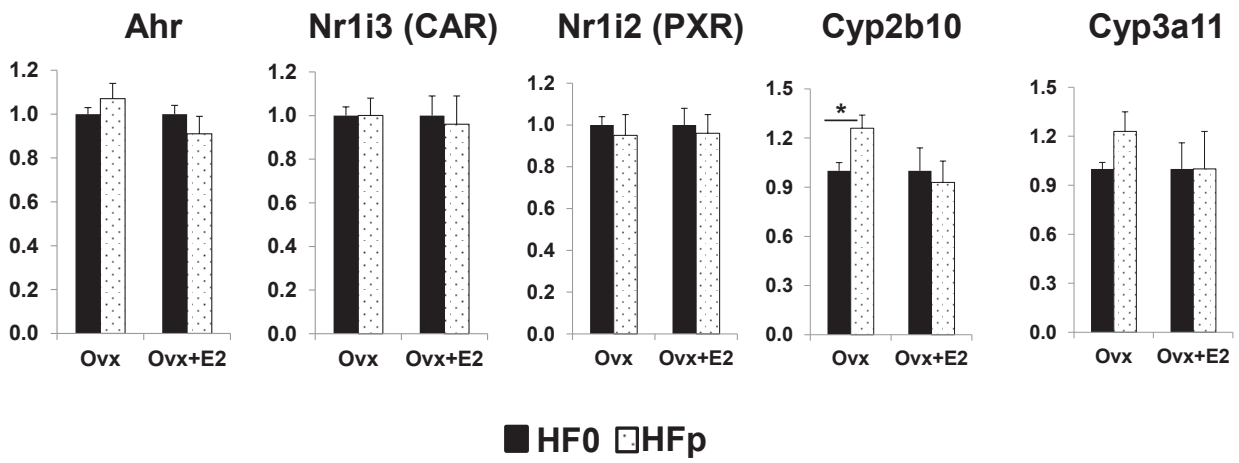
Supplemental Figure 4: Phenotype and biochemical characterization of Standard-fed Ovx versus standard-fed sham-operated mice. Standard: standard chow diet; Sham: sham operated mice; Ovx: ovariectomized mice; SAT: subcutaneous adipose tissue; VAT: visceral adipose tissue. Values are mean ± SEM (n=4-5). *p<0.05; **p<0.01, ***p<0.001.



Supplemental Figure 5: Impact of E2 replacement on adipocyte size. Representative laminin immunostaining of paraffin section of adipose tissues obtained from mice fed HFHS diet and ovariectomized without (Ovx) or with (Ovx+E2) estrogen replacement. Adipose tissue acquisition is represented for subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) depots using objective x10. Scale bar=100µm



Supplemental Figure 6: Comparison between treatment-matched HF0-fed and HFp-fed mice. **A.** Body and adipose tissue weights; **B.** Blood glucose, plasma insulin and HOMA-IR. **C.** Glucose Tolerance Test. HF0: pollutant-free high-fat high-sucrose diet; HFp: high-fat high-sucrose diet containing the mixture of pollutants. Sham: non-operated mice; Ovx: ovariectomized mice; Ovx+E2: ovariectomized mice with E2 replacement.; SAT: subcutaneous adipose tissue; VAT: visceral adipose tissue. Values are mean ± SEM (n=6-8).



Supplemental Figure 7: Effect of the mixture of pollutant on the expression of xenobiotic processing genes in liver**.** Results are expressed as HFp/HF0 ratio for each group of mice with ratio equal to 1.0 for the HF0 groups. HF0: high-fat high-sucrose diet pollutant-free; HFp: high-fat high-sucrose diet containing the mixture of pollutants. Sham: not operated mice; Ovx: ovariectomized mice; Ovx+E2: ovariectomized and E2 replaced mice. Values are mean ± SEM (n=6-8). *$p<0.05$.

Supplemental table

Supplemental table 1: List of the primers used for qPCR analyses

		sequences: 5'->3'	
gene	reference	sense	antisense
Ahr	NM_013464.4	TCA-TCT-GGT-TTC-CTG-GCA-ATG-AAT	ATA-AGC-TGC-CCT-TTG-GCA-TC
Atoh1	NM_007500	CAG-CGA-TGA-TGG-CAC-AGA-AG	TGG-TTG-TCT-CAG-TTT-TCA-GG
Ccl2	NM_011333	TGG-AGC-ATC-CAC-GTG-TTG-GC	ACT-ACA-GCT-TCT-TTG-GGA-CA
Cd36	NM_001159558.1	AAG-ATC-CAA-AAC-TGT-CTG-TA	GTC-CTG-GCT-GTG-TTT-GGA-GG
Cldn2	NM_016675	CCT-TCG-GGA-CTT-CTA-CTC-GC	TCA-CA-CAT-ACC-CAG-TCA-GGC
Cpt1a	NM_001876;NM_001031847	TAC-AAC-AGG-TGG-TTT-GAC-A	GGC-TGT-CAA-TGG-ACA-TGA-CG
Cyp3a11	NM_007818	ACG-CCT-CTC-CTT-GCT-GTC-ACC	TTG-CCT-TCT-GCC-TCA-AGT-AC
Cyp7a1	NM_007824.2	TAC-AGA-GTG-CTG-GCC-AAG-AG	AGT-GAA-GTC-CTC-CTT-AGC-TG
Cyp2b10	NM_009999	TTC-TGC-CCT-TCT-CAA-CAG-GA	CCT-TAG-GAG-CAA-CAT-GGC-TT
Dgat2	NM_026384	AAG-GGC-TTT-GTG-AAA-CTG-GC	CCT-CCT-CGA-AGA-TCA-CCT-GC
Esr1	NM_000125;NM_001122740;NM_001122741;NM_001122742	TGT-TTG-CTC-CTA-ACT-TGC-TC	CCT-TCT-CTT-CCA-GAG-ACT-TC
Esr2	NM_207707; NM_010157	CTC-TTC-CCA-GCA-GCA-GTC-AGT-C	AGC-ATC-TCC-AGC-AGC-AGG-T
Fabp4	NM_024406	CAG-AAG-TGG-GAT-GGA-AAG-TCG	CGA-CTG-ACT-ATT-GTA-GTG-TTT-GA
Gck	NM_010292	CAA-CTG-GAC-CAA-GGG-CTT-CA	CCA-GCT-CCA-CAT-TCT-GCA-TC
Got2	NM_010325	ATG-GTG-AAG-GAT-GCC-TGG	TTC-ATC-CGC-ATC-TTT-GCA-GAC-C
G6pc	NM_008061	TTA-CCA-AGA-CTC-CCA-GGA-CTG	GAG-CTG-TTG-CTG-TAG-TAG-TC
Gper1	NM_029771	AGC-TGA-TCA-GAT-CTA-GGG-AG	GTC-CTG-GGA-GCC-TGT-TAG-TC
Hmgcr	NM_008255	CCG-GCC-TGT-GTG-TCG-CTG-GT	CCA-GCG-ACT-ATG-AGC-GTG-AA
Il1b	NM_008361	ACT-GTT-CCT-GAA-CTC-AAC-TG	CTT-GTT-GAT-GTG-CTG-CTG-CG
Il12a	NM_001159424,NM_008351	GAC-ATC-GAT-CAT-GAA-GAC-ATC-AC	TAC-CAA-GGC-ACA-GGG-TCA-TC
Lcn2	NM_008491	TCA-CTC-TGG-GAA-ATA-TGC-AC	ATG-ATG-TTG-TCG-TTG-AG
Ldlr	NM_001252658,NM_001252659,NM_010700	GTT-GAT-TCC-AAA-CTC-CAC-TC	TTC-ACA-TCT-GAA-CCC-GTG-AG
Lep	NM_008493	CAC-CAG-GAT-CAA-TGA-CAT-TTC	TGC-CAG-TGT-CTG-GTC-CAT-CTT-G
Lipe	NM_001039507,NM_010719	GTG-TGT-CAG-TGC-CTA-TTC-AG	GTC-AGC-TTC-TTC-AAG-GTA-TC
Lpl	NM_008509	GGT-CGA-AGC-ATT-GGA-ATC-CAG	TAG-GGC-ATC-TGA-GAA-CGA-GTC
Mmp7	NM_010810; NM_001319986	ACG-ACA-TTG-CAG-GCA-TTC-AG	GTT-CAT-GCC-AGC-TGA-GGG-AT
Muc2	NM_023566	GCT-ATG-ACG-TCT-GTG-TGA-AG	CAA-ACA-CAG-TCC-TTG-CAG-TC
Ngn3	NM_009719	GCT-ATC-CAC-TGC-TGC-TTG-AC	TGG-AAT-TGG-AAC-TGA-GCA-CTT
Npc1l1	NM_207242	GCT-AGC-AGC-CAA-CAT-CAC-AG	CAG-TAG-GAG-GTA-GCA-GAC-CA
Nr0b2	NM_011850	CTG-CCT-GGA-GTC-TTT-CTG-GA	GTG-CCT-GGA-ATG-TTC-TTG-AG
Nr1c1	NM_011144; NM_001113418.1	AAG-GGC-TTC-TTT-CGG-CGA-AC	GTT-CAT-GTT-GAA-GTT-CTT-CAG
Nr1c3	NM_001127330,NM_011146	TCT-CTC-CGT-AAT-GGA-AGA-CC	GCA-TTA-TGA-GAC-ATC-CCC-AC
Nr3c4	NM_013476.3	AGA-AGA-CCT-GCC-TGA-TCT-G	GCT-GGC-ACA-TAG-ATA-CTT-CTG
Nr1h3	NM_013839	CCG-GGA-AGA-CTT-TGC-CAA-AGC	GGA-GCT-GGT-CCT-GCA-CGT-TG
Nr1h4	NM_001163700.NM_001163504,NM_009108	GCA-ACC-TGT-TGG-AAG-AAA-G	GTC-TGT-CTG-GAG-AGA-GGA-TG
Nr1i2	NM_010936.3	AGG-AGG-AGT-ATG-TGC-TGA-TG	CTT-CAG-GAA-CAG-GAA-CCT-GTG
Nr1i3	NM_001243063;NM_001243062;NM_009803	GTC-CCA-TCT-GTC-CGT-TTG-C	AGG-GCT-TCT-GAC-AGT-ATC
Pcsk9	NM_153565	AAC-TGC-AGC-ATC-CAC-AAC-AC	CAG-CAG-GAA-GCA-TAG-ACA-CT
Pnpla2	NM_025802,NM_001163689	TCA-TC-CAG-GCC-AAT-CTC-TGC	TGG-ATG-TTG-GTG-GAG-CTG-TC
Scd1	NM_009127	GAT-ACA-CTC-TGG-TGC-TCA-AC	AAC-GTG-GTG-AAG-TTG-ATG-TG
Slc2a2	NM_031197	TGG-GTA-CTC-TTC-ACC-AAC-TG	AGG-ATG-TGC-CAA-TGA-TCC-TG
Slc5a1	NM_019810	GCT-CCT-TGA-CCT-CCA-TCT-TC	CAG-GCA-ATG-CTG-ATG-CCA-AT
Srebf1	NM_011480	ACG-GAG-CCA-TGG-ATT-GCA-CA	AAG-GGT-GCA-GGT-GTC-ACC-TT
Srebf2	NM_033218	CCT-GTG-ATG-ATG-GGG-CAA-GAG	CCT-CAG-AAC-GCC-AGA-CTT-G
Tbp	NM_013684	TGG-TGT-GCA-CAG-GAG-CCA-AG	TTC-ACA-TCA-CAG-CTC-CCC-AC
Tjp1	NM_009386	ACG-CAT-CAC-AGC-CTG-GTT-G	TGG-CTC-CTT-CCT-GTA-CAC-C
Tnfa	NM_013693	CCA-GAC-CCT-CAC-ACT-CAG-ATC	CAC-TTG-GTG-GTT-TGC-TAC-GAC

Discussion générale

Nous sommes constamment exposés dans notre environnement, et, en particulier, par l'alimentation, à une multitude de polluants chimiques à faibles concentrations. Aujourd'hui, plus d'un millier de ces substances est considéré comme des perturbateurs endocriniens. Parmi eux, certains sont capables d'exercer des effets délétères sur le métabolisme énergétique, comme l'obésité et le diabète sucré. On parle alors de molécules obésogènes ou diabétogènes.

Des travaux expérimentaux, menés au laboratoire, ont montré, chez la souris, que l'exposition chronique à un mélange de 4 polluants (TCDD, PCB153, BPA, DEHP), à des doses très faibles, combinée à une alimentation enrichie en lipides et en saccharose, et proposée aux mères puis à leur descendance, est à l'origine de fortes perturbations métaboliques (208). Ces effets dépendraient non seulement de l'âge, du sexe et du contexte nutritionnel, mais également du statut hormonal (210), nous conduisant à émettre l'hypothèse d'un effet de type œstrogéno-mimétique du mélange de polluants utilisés.

Ce travail de thèse a donc eu pour objectif de développer un modèle expérimental d'ovariectomie, afin de mieux caractériser les effets possiblement œstrogéniques du cocktail de polluants, et de les comparer aux effets purement œstrogéniques de l'œstradiol délivré à l'aide d'implants sous-cutanés.

Il s'agit donc d'adapter le modèle d'exposition chronique à un mélange de polluants représentatifs d'un modèle d'exposition réaliste, développé il y a quelques années au laboratoire. Précisément, les souris nourries avec un régime riche en lipides et en saccharose (HFHS) ont été ovariectomisées pour mimer un déficit en œstrogènes. Elles ont ensuite reçu, en sous-cutané, des implants contenant ou non du 17β-œstradiol (E2). Cette chirurgie permet de restaurer plusieurs paramètres métaboliques à des valeurs similaires à celles des souris contrôles (= souris opérées et non ovariectomisées, ou sham), mais pas tous. En effet, les ovaires produisant également des progestagènes et des androgènes, l'administration d'E2 n'est pas sensée permettre de reproduire tous les effets métaboliques présents chez les souris sham.

En utilisant ce modèle expérimental, les travaux présentés dans cette thèse ont permis d'apporter des éléments nouveaux :

- D'une part, nous avons caractérisé les effets du mélange de polluants en exposition chronique dans un modèle de souris femelles, incluant ou non la période maternelle.
- D'autre part, nous avons amélioré la compréhension des conséquences métaboliques de la déficience en E2 en condition de régime obésogène.

Parmi les résultats présentés dans les 2 études, un certain nombre d'entre eux seront traités dans les points de discussion suivants :

1. Caractérisation du phénotype métabolique des souris ovariectomisées
2. Effets de l'œstradiol, en particulier sur le métabolisme hépatique du cholestérol
3. Effets des polluants sur le profil métabolique des souris ovariectomisées
4. Caractéristiques de l'impact des œstrogènes selon les dépôts adipeux (sous-cutané *vs* viscéral)
5. Comparatif des effets induits par les polluants avec les effets de l'œstradiol
6. La question des mélanges : extrapolation des résultats du travail de thèse à la situation d'une exposition multiple
7. Les limites du travail expérimental.

1 Caractérisation du métabolisme énergétique chez les souris ovariectomisées

La première étape de ce travail de thèse a été de caractériser le phénotype métabolique des souris femelles ovariectomisées nourries sous régime gras-sucré (HFHS). Dans la suite des résultats du laboratoire (208), nous avons observé une obésité associée à une intolérance au glucose et une insulino-résistance chez les souris nourries avec le régime HFHS.

Nos résultats montrent que le déficit en œstrogènes, combiné à un régime standard ou obésogène, altère le phénotype métabolique des souris femelles. En effet, après ovariectomie, un gain de poids supplémentaire associé à une augmentation de la masse grasse est observé chez les souris femelles nourries avec une régime HFHS, résultats rejoignant ceux décrits dans de précédentes études (57,86,106,216,217). Les taux plasmatiques de leptine sont plus élevés, en accord avec la relation proportionnelle entre les niveaux circulants de leptine et l'expansion de la masse grasse. On observe également une augmentation de l'insulinémie associée à une intolérance au glucose et une insulino-résistance. Ces résultats ont aussi été observés chez les souris nourries avec un régime standard.

L'insulino-résistance chez les souris ovariectomisées, nourries au régime HFHS, est accompagnée d'une augmentation des taux circulants d'acides gras libres. On sait que cette dyslipidémie, associée à une lipolyse accrue du tissu adipeux, provoque un état de lipotoxicité pouvant favoriser l'accumulation de lipides dans le foie. Or, dans notre modèle, nous n'observons ni de stéatose hépatique, ni d'augmentation de l'expression des marqueurs de toxicité hépatique tels que l'alanine aminotransférase (ALAT) et l'aspartate aminotransférase (ASAT). L'insulino-résistance n'altérerait donc pas la structure du foie, soit parce qu'elle ne serait pas assez forte, soit parce qu'elle serait encore trop précoce pour induire des effets délétères sur le foie.

Dans le tissu adipeux, l'ovariectomie induit une augmentation de l'expression de l'ARNm *Ccl2*, dont le gène code pour la protéine MCP-1 qui exerce une activité d'attraction sur certaines cellules immunitaires dont les macrophages. Des études ont montré que la surexpression de MCP-1 déclenche une inflammation du tissu adipeux et une insulino-résistance (46), tandis que sa déficience est associée à une amélioration des paramètres métaboliques chez les souris nourries au régime gras (218). De plus, les niveaux plasmatiques de MCP-1 sont augmentés dans des conditions de déficience en œstrogènes comme la

ménopause (219) ou l'ovariectomie (90). Nos résultats indiquent que la supplémentation en E2 baisse l'expression de *Ccl2* dans les tissus adipeux. D'autres études ont également montré que *Ccl2* était négativement régulé par l'œstradiol (220–222), lui conférant un rôle d'indicateur du statut œstrogénique en systémique. Il serait intéressant de le confirmer dans de futurs travaux en effectuant un dosage plasmatique de MCP-1.

2 Effets de l'œstradiol, en particulier sur le métabolisme hépatique du cholestérol

Chez les souris femelles nourries au régime HFHS, l'E2 déclenche 2 types de réponses sur le phénotype métabolique des souris :

- Soit une normalisation des valeurs à celles du groupe de souris sham, ce qui est le cas pour la tolérance au glucose, équivalente entre les souris ovariectomisées et les souris sham.

- Soit une amélioration, au-delà des effets liés à l'ovariectomie, c'est-à-dire que les valeurs des paramètres observés avec la supplémentation en E2 se rapprochent de celles retrouvées chez les souris sham, comme pour la masse des tissus adipeux.

Nos résultats étendent ceux de Bryzgalova *et al.* qui ont montré que l'E2 a des propriétés anti-obésogènes et anti-diabétogènes dans un modèle de souris femelles nourries en régime gras pendant 10 mois, et ayant reçu en sous-cutané de l'E2 pendant le dernier mois de régime. Les auteurs ont alors observé une baisse du poids corporel, une amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline, et une diminution de l'expression du gène de la leptine dans le tissu adipeux (223). Les conséquences liées à la perte de poids chez les souris supplémentées en E2 sont la diminution de la taille des adipocytes du tissu adipeux sous-cutané (TAsc) et du tissu adipeux viscéral (TAv), ainsi que la diminution de l'expression de marqueurs de la lipogenèse (Lpl, Fabp4) dans le TAsc.

Nos résultats indiquent également que la supplémentation en E2 altère le métabolisme du cholestérol en plus de changer la quantité d'ARNm d'*Esr1* dans le foie, suggérant un lien entre la signalisation œstrogénique et le métabolisme des lipides. L'altération du métabolisme du cholestérol dans le foie, observé lors de la supplémentation en E2, fait suite à des données précédentes démontrant que le traitement de souris femelles avec de fortes doses d'E2 peut perturber la régulation du rétrocontrôle négatif de la biosynthèse du cholestérol par un mécanisme dépendant d'ERα (224).

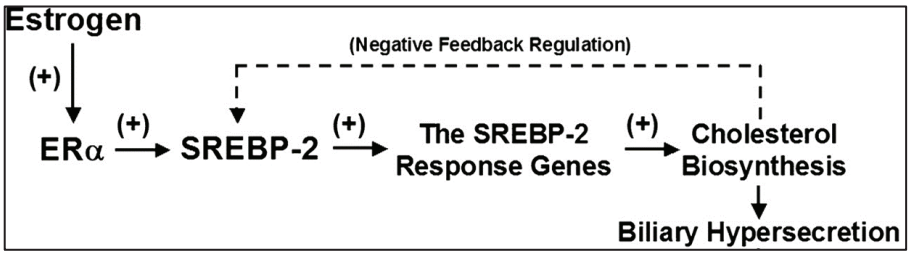


Figure : Perturbation de la boucle de rétrocontrôle négative de la biosynthèse du cholestérol dans le foie par l'activation d'ERα médiée par l'excès d'œstradiol (Adapté de Wang HH., 2006 (224))

La dérégulation du métabolisme des lipides peut provenir également de l'absence de cycles chez les femelles ovariectomisées supplémentées en E2 (91). En effet, l'activité transcriptionnelle d'ERα dans le foie de souris femelles oscille au cours des 4 phases du cycle œstral de la souris (proœstrus, œstrus, metœstrus et diœstrus). Or, cette oscillation de l'activité transcriptionnelle d'ERα est nécessaire à la régulation physiologique de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des acides gras et du cholestérol. La perturbation de l'activité transcriptionnelle d'ERα dans le foie par l'ovariectomie est associée à une perte de la rythmicité dans l'expression des gènes du métabolisme des lipides. L'apparition d'une stéatose hépatique en est une des conséquences métaboliques.

Nos résultats sont ainsi en accord avec l'idée que le métabolisme des lipides échappe au rétrocontrôle physiologique chez les femelles ovariectomisées supplémentées en E2.

3 Effets des polluants sur le profil métaboliques des souris ovariectomisées

Ce travail de thèse a permis de montrer que, dans notre modèle d'ovariectomie, combinée à un régime HFHS, l'exposition au mélange de polluants régule le métabolisme glucidique et lipidique, possiblement par des propriétés œstrogéno-mimétiques. Ces résultats font échos à ceux obtenus dans une étude antérieure (210), où les profils métaboliques de souris femelles âgées de 7 semaines, immatures sur le plan hormonal, et de souris femelles adultes de 12 semaines, dont les taux d'œstrogènes sont élevés, ont été comparés dans un contexte de régime HFHS.

- Chez les femelles âgées de 7 semaines, l'exposition au cocktail de polluants réduit la masse grasse, améliore la tolérance au glucose et la sensibilité musculaire à l'insuline, et réduit l'expression des marqueurs inflammatoires dans le TAsc.

- Chez les femelles âgées de 12 semaines, les polluants aggravent l'intolérance au glucose et l'inflammation du tissu adipeux.

De cette étude, il en ressort que les polluants auraient un effet, en deux temps, sur le métabolisme : un premier impact positif apparent chez les jeunes femelles, suivi d'un impact négatif chez les femelles adultes.

Une des hypothèses permettant d'expliquer cet effet « biphasique », et qui a été mentionnée dans les objectifs de thèse, pourrait être que ce mélange de polluants possèderait une activité œstrogéno-mimétique lorsque les niveaux plasmatiques d'E2 sont faibles, protégeant les souris femelles de 7 semaines des effets métaboliques délétères occasionnés par le régime HFHS. Dans notre modèle de souris ovariectomisées nourries avec le régime HFHS, l'exposition au mélange de polluants est associée à une amélioration de la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline (225). L'augmentation de l'expression d'*Esr1* dans le foie et la diminution de l'expression de *Ccl2* dans le TAv pourraient être des mécanismes de régulation positive du métabolisme dans ce modèle.

Dans la seconde étude, les femelles ovariectomisées n'ont pas été exposées aux polluants depuis la vie fœtale mais à partir de la 5e semaine de vie. La mixture de polluants élaborée par notre équipe ne modifie pas le poids corporel, ce qui est en accord avec nos travaux précédents sur des souris exposées *in utero* (208,210,226). Toutefois, aucun impact sur la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline chez les souris ovariectomisées n'est observé en réponse aux polluants. L'exposition aux polluants conduirait plutôt à des effets métaboliques indésirables. Par exemple, on observe que les polluants diminuent les niveaux plasmatiques d'adiponectine chez les souris ovariectomisées supplémentées en E2. L'adiponectine est une adipokine, aux propriétés métaboliques bénéfiques, capable d'augmenter la sensibilité à l'insuline dans le foie et le tissu adipeux (26). On observe également que les polluants tendent à augmenter le contenu hépatique en triglycérides, et altèrent l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides dans le foie (*Cd36*, *Nr0b2*, *Nr1h3* et *Cyp7a1*) chez les souris ovariectomisées. Aucune activité œstrogéno-mimétique du mélange de polluants n'a été rapportée dans le foie. Cependant, l'augmentation de l'expression de l'ARNm *Esr1* dans le TAsc des souris ovariectomisées exposées aux polluants par rapport à celles non exposées suggère que les polluants stimuleraient la signalisation œstrogénique dans les tissus adipeux.

L'étude 2 ne reproduit pas complètement les données de l'étude 1 (225). Une explication possible réside dans la période d'exposition aux polluants. Dans l'étude 1, les souris femelles ont subi une exposition maternelle englobant le stade *in utero*, la gestation et la lactation. Dans l'étude 2, les souris femelles n'ont été exposées qu'après la naissance, entre la 5e et la 20e semaine de vie. D'après l'hypothèse de l'origine développementale des maladies développée par Barker *et al.*, la période fœtale est une période de forte sensibilité à des stress environnementaux comme l'exposition aux polluants, et peut affecter le métabolisme à l'âge adulte (144,227). Par exemple, l'exposition au BPA pendant le stade fœtal altère l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme et la signalisation œstrogénique dans le foie (228). Dans cette étude, la descendance de souris gestantes traitées avec du BPA, délivré de manière constante entre le 9e et le 18e jour de gestation, par l'intermédiaire d'une pompe osmotique placée dans la cavité péritonéale, a été analysée. Les auteurs ont remarqué que l'exposition *in utero* au BPA stimule l'expression hépatique des gènes *Esr1* et *Esr2* chez la descendance femelle ovariectomisée. En accord avec les travaux d'Ilagan *et al.*, nous observons également une augmentation de l'expression d'*Esr1* dans le foie des souris femelles ovariectomisées exposées au mélange de polluants pendant la période prénatale. Le BPA possède une action œstrogénique qui pourrait jouer un rôle dans la programmation fœtale et le développement de maladies métaboliques. On peut alors supposer que le BPA, présent dans notre mixture de polluants, pourrait être tout ou partie responsable des effets œstrogéno-mimétiques observés chez la descendance exposée pendant la période prénatale.

4 Caractéristiques de l'impact des œstrogènes selon les dépôts adipeux (sous-cutané *vs* viscéral)

Nos travaux montrent que les œstrogènes impactent différemment le TAsc et le TAv. En effet, l'E2 régule de manière différente l'expression des marqueurs de l'adipogenèse et de l'inflammation, en fonction de la localisation du tissu adipeux :

- L'expression des ARNm des gènes impliqués dans l'adipogenèse (*Fabp4*, *Lipe*, *Lpl*) dans le TAsc augmente chez les souris ovariectomisées et se normalise avec l'administration d'E2. L'E2 régulerait négativement l'adipogenèse dans le TAsc, ce qui est en accord avec la diminution de la masse du TAsc observée chez les souris ovariectomisées traitées avec de l'E2. Dans le TAv, le statut œstrogénique n'altère pas l'expression des gènes de l'adipogenèse. Cependant, l'E2 augmente l'expression de *Nr1c3* (PPARγ) et *Atlg*, 2 marqueurs de la différenciation des adipocytes, dans le TAv.

Ceci suggère une augmentation de la différenciation adipocytaire dans le TAv des souris ovariectomisées traitées avec l'E2, ce qui est contradictoire avec la diminution de la masse du TAv observée chez ces mêmes souris. Il serait intéressant de compléter cette analyse par une quantification d'autres marqueurs de la différenciation adipocytaire, comme le facteur de transcription de la famille C/EBP par exemple, afin d'étendre nos résultats.

- Dans le TAv, l'expression des marqueurs de l'inflammation (*Ccl2*, *Tnfα*, *Il-1β* et *Il-12*) augmente chez les souris ovariectomisées, et se normalise avec la diffusion de l'E2 par les implants sous-cutanés. Cette régulation négative des marqueurs de l'inflammation par l'E2 ne s'observe que pour *Ccl2* dans le TAsc. Ces observations viennent étendre celles observées dans d'autres études, où l'augmentation de l'adiposité viscérale chez des souris ovariectomisées est associée à une augmentation de l'expression de marqueurs pro-inflammatoires dans le tissu adipeux (87–90,216).

Ces résultats suggèrent donc que les différents dépôts adipeux ont des fonctions différentes dans le développement des troubles métaboliques liés à l'obésité chez les souris femelles. Dans le tissu adipeux, la dérégulation de la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires contribue à l'installation progressive d'une inflammation à bas bruit, participant au développement de l'insulino-résistance induite par l'obésité. Les œstrogènes réguleraient ainsi la distribution et l'expansion de la masse grasse plutôt au niveau sous-cutané et l'inflammation plutôt au niveau viscéral, protégeant de l'insulino-résistance.

Concernant les récepteurs aux œstrogènes (ERα, ERβ et GPER), leur abondance est différente selon la localisation du tissu adipeux. Par exemple, l'expression d'*Esr1* est multipliée par 10 dans le TAv par rapport au TAsc, alors que l'expression de *Gper1* est multipliée par 2 dans le TAsc en comparaison du TAv. En comparaison de ces 2 récepteurs, *Esr2* est très faiblement exprimé dans les 2 dépôts adipeux. De plus, les œstrogènes régulent différemment l'expression de chaque récepteur, mais de la même manière dans le TAsc et le TAv. Les différences de quantité et d'expression de ces récepteurs observées entre les 2 dépôts adipeux suggèrent des sensibilités différentes aux œstrogènes.

Nos résultats montrent que l'ovariectomie, associée à une obésité, régule négativement l'expression d'*Esr2* (gène codant pour le récepteur ERβ), alors que la supplémentation en E2 tend à normaliser son expression. L'inverse est observé pour *Gper1*, gène codant pour le récepteur GPER. Ces résultats montrent que le phénotype d'obésité liée à l'ovariectomie est

associé à l'augmentation de l'expression de *Gper1* et à la diminution de l'expression d'*Esr2* dans les tissus adipeux. L'analyse des phénotypes de souris déficientes pour les récepteurs ERβ (ERβ$^{-/-}$) et GPER (GPER$^{-/-}$) vont dans le même sens que nos observations. En effet, une augmentation de l'adiposité est observée chez les souris femelles ERβ$^{-/-}$ (229), et une protection contre l'obésité induite par un régime obésogène chez les souris femelles GPER$^{-/-}$ (230).

La supplémentation en E2 stimule fortement l'expression d'*Esr1*, ainsi que celle de *Nr3c4* (AR) dans les 2 tissus adipeux. Ce phénomène peut être associé à la baisse importante de la masse du TAsc et du TAv, ce qui est constaté dans d'autres études (106,229,231).

L'expression des gènes *Ccl2* et *Lep* (codant pour la leptine) varie de la même manière dans les 2 tissus adipeux : elle augmente en condition d'ovariectomie et revient à une valeur comparable à celle des souris sham avec la supplémentation en E2. La régulation négative de l'expression de *Ccl2* et *Lep* par l'E2 dans les tissus adipeux pourrait provenir de la stimulation d'ERβ ou de l'inhibition de GPER, comme le suggère le profil d'expression des gènes *Esr2* et *Gper1*.

5 Comparatif des effets induits par les polluants avec les effets de l'œstradiol

Bien que le mélange de polluants utilisé dans nos travaux réduise l'impact négatif de l'ovariectomie sur la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline, les effets œstrogéno-mimétiques sont cependant de faible amplitude. Alors que l'ovariectomie conduit à un gain de poids et une atrophie de l'utérus, comme décrit dans la littérature (53), les polluants ne miment pas les effets liés à la restauration des œstrogènes sur le poids corporel, ni sur le poids de l'utérus. Ceci peut indiquer que l'activité œstrogéno-mimétique du mélange de polluants est relativement faible.

L'évaluation des paramètres biochimiques montre que la déficience en œstrogènes induite par l'ovariectomie est responsable d'une augmentation des taux plasmatiques d'insuline, d'acides gras libres, de leptine, de cholestérol et de triglycérides, qui sont pour la plupart normalisés par l'administration d'E2. Un bon nombre de ces observations a également été rapporté dans des études antérieures sur des modèles de souris ovariectomisées supplémentées en E2 (88,92,232). Hormis une diminution de la concentration plasmatique en triglycérides par les

polluants en condition d'ovariectomie, aucun autre paramètre n'est modifié par la présence de polluants.

Ces résultats laissent à penser que la sensibilité à l'insuline serait un paramètre très sensible répondant très rapidement à l'activité œstrogéno-mimétique des polluants, alors que la normalisation du poids corporel, du poids de l'utérus et des niveaux circulants de leptine et d'acides gras libres dépendrait d'une activité œstrogénique plus importante. De manière intéressante, il a été démontré que la normalisation de la sensibilité à l'insuline et de la tolérance au glucose précède celle du poids corporel et de l'adiposité dans un modèle d'ovariectomie après supplémentation en E2 (86,216).

6 La question des mélanges : extrapolation des résultats du travail de thèse à la situation d'une exposition multiple

Ce contexte d'exposition aux polluants a été choisi afin de se rapprocher d'un scénario d'exposition réaliste. Le choix des polluants de la mixture a reposé sur plusieurs critères :

i. Le mélange comprend 2 POP (TCDD, PCB153), ainsi que 2 polluants non persistants (BPA, DEHP). Ces POP ont une demi-vie pouvant atteindre une dizaine d'années, et s'accumulent, avec le vieillissement, dans le tissu adipeux grâce à leur propriété lipophile. Les polluants non persistants sont massivement produits par l'industrie du plastique (les productions en Europe se chiffrent entre 3 millions (BPA) et 340 000 (DEHP) tonnes par an). Malgré leur faible demi-vie dans les matrices biologiques due à leur métabolisation très rapide, leur caractère ubiquitaire nous expose continuellement à ces produits chimiques.
ii. Chaque polluant est le plus représentatif de sa classe. Dans la famille des dioxines, la TCDD, également appelée « dioxine de Seveso », est le congénère le plus puissant. Le PCB153 est le congénère majoritaire des polychlorobiphényles. Parmi les composés phénoliques, le BPA est très répandu dans l'environnement. Enfin, le DEHP est le phtalate le plus répandu.
iii. Chaque polluant a des propriétés de perturbateur endocrinien et est suspecté d'être impliqué dans l'étiologie des maladies métaboliques d'après plusieurs études épidémiologiques et expérimentales robustes (voir introduction).

iv. Ces polluants sont administrés dans une nourriture riche en saccharose et en lipides. Ceci permet de mimer une alimentation de type occidentale particulièrement riche en lipides d'origine animale et pouvant être contaminée par des POP lipophiles.

v. Ces polluants empruntent des voies de signalisation différentes, impliquant l'activation de récepteurs nucléaires eux-mêmes capables de cross-talks (201). Pour les phtalates tel que le DEHP, l'effet résultant est plutôt anti-androgénique alors que le BPA est pro-œstrogénique.

vi. Chaque polluant est utilisé à une dose faible, supposée sans effet chez l'homme (voir introduction). En effet, le dosage des polluants est basé sur la Dose Journalière Tolérable (DJT) définie empiriquement par des agences d'évaluation des risques (233). Ainsi, les polluants ne sont pas supposés générer des effets métaboliques individuellement. La démonstration que plusieurs gènes sont impactés (au moins au niveau des ARNm) par le mélange de polluants, ainsi que les données précédentes sur les effets métaboliques indésirables des mélanges de polluants à faible dose (234), suggèrent que la législation actuelle sur l'évaluation des risques des produits chimiques sous-estime les risques et doit être mise à jour.

7 Les limites du modèle

Ce travail de thèse a permis de valider un modèle d'étude de la régulation du métabolisme chez les souris femelles ovariectomisées et supplémentées en œstradiol. Cependant, comme tout travail, il présente certaines limites. En voici trois exemples :

i. Aujourd'hui, l'exposition, à long terme, à de faibles doses de polluants en mélange, est considérée comme un scénario pouvant impliquer de multiples interactions potentielles entre différents polluants. Or, plus le nombre de polluants augmente, plus il y a de chance de voir apparaître des interactions entre eux, ce qui complique l'étude des effets des mélanges. Ici, nous ne sommes pas en mesure de définir si les effets œstrogéno-mimétiques observés dans un contexte d'exposition maternelle sont le résultat d'effets additifs, synergiques ou antagonistes d'un ou plusieurs polluants du mélange, ou de leurs métabolites. La molécule TCDD possède des activités anti-œstrogéniques *in vitro* et *in vivo* (235), le DEHP est généralement décrit comme un puissant anti-œstrogène et anti-androgène (236) et le BPA et les PCB possèdent des

activités œstrogéno-mimétiques (237,238). Pour évaluer les effets de mélanges de produits chimiques, deux approches complémentaires peuvent être utilisées : (1) tester l'ensemble du mélange ou (2) tester les composants individuels du mélange. Ensuite, des hypothèses sont formulées sur la base des connaissances / incertitudes relatives aux composés du mélange. Effectuer des tests *in vivo* d'exposition à des mélanges de polluants permet d'évaluer les effets sur un organisme entier. Cependant, les substances à l'origine de la réponse globale restent souvent non identifiées, ainsi que les interactions potentielles entre les composants du mélange. Peut-être que dans notre modèle, les effets œstrogéniques seraient le résultat d'une action prépondérante du BPA et du PCB153. Une approche plus courante consiste à examiner la toxicité de chacun des constituants, suivie d'une modélisation mathématique permettant de prédire l'effet combiné. Cette approche analytique soulève cependant la question du respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) en expérimentation animale. Travaillant sur des souris au laboratoire, tester les effets de chaque polluant nécessiterait un plus grand nombre d'animaux, ce qui va à l'encontre des règles éthiques visant à réduire le nombre d'animaux utilisés en expérimentation. L'idée serait alors d'effectuer des tests sur des cellules en cultures, exposées à chaque polluant individuellement puis en combinaison, afin d'élargir la compréhension des effets observés *in vivo* et de ne plus utiliser d'animaux dans nos expérimentations.

ii. Une autre limite expérimentale de notre modèle concerne l'induction de la déficience en œstrogènes. L'ovariectomie est souvent utilisée chez les rongeurs pour induire une ménopause aigüe, ce qui a pour conséquence la modification rapide de paramètres métaboliques comme le poids corporel. En effet, dans nos protocoles, nous observons les premières différences significatives de poids corporel entre les souris ovariectomisées et les souris sham 2 semaines seulement après l'ablation des ovaires. A l'inverse, la ménopause est un processus physiologique complexe et progressif incluant plusieurs étapes dont une insuffisance ovarienne, un excès d'androgènes, une adiposité viscérale accrue et une réduction de l'activité physique. De plus, contrairement à l'ovariectomie où les ovaires sont retirés chirurgicalement, ceux-ci restent présents chez les femmes post-ménopausées et continuent de produire des stéroïdes sexuels. En effet, des analyses d'homogénats ovariens de 207 femmes ménopausées ont montré que l'œstradiol et la testostérone continuent d'être

synthétisés par les ovaires 5 ans après la ménopause, avant d'être significativement réduits avec le vieillissement (239).

iii. Le niveau d'exposition aux polluants chimiques peut être évalué par la quantité de ces substances dans l'organisme. Malheureusement, nous n'avons pas pu quantifier la présence des polluants du mélange dans les matrices biologiques, ou dans le tissu adipeux qui est l'organe de bioaccumulation des POP, et le foie responsable du métabolisme des xénobiotiques. Cependant, d'anciens résultats non publiés font état d'une concentration de PCB153 de 30,9 ng/g de lipides dans le foie et 34,2 ng/g de lipides dans le tissu adipeux de souris adultes âgées de 12 semaines, non-obèses et exposées au mélange de polluants. Parmi les 4 polluants du mélange, dosés par spectrométrie de masse, le PCB153 était le seul à dépasser le seuil de détection de l'appareil. Ces concentrations peuvent être comparées à celles retrouvées chez les femmes dans des études épidémiologiques. Par exemple, parmi les 41 PCB quantifiés dans une cohorte de 110 femmes canadiennes post-ménopausées entre 2003 et 2004, les concentrations plasmatiques moyennes du principal congénère (PCB153) s'élevaient à 41,7 ng/g de lipides (240). Une cohorte brésilienne de 155 femmes enceintes rapporte des concentrations plasmatiques de PCB153 de 7,2 ng/g de lipides chez celles vivant dans des zones industrielles (241). Les concentrations plasmatiques de PCB153 ont également été quantifiées chez 48 femmes enceintes, issues de la cohorte PROTECT à Puerto Rico, et comparées à celles des femmes de la cohorte NHANES âgées de 18 à 40 ans, entre 2003 et 2004 (242). Les résultats montrent que les concentrations médianes de PCB153 sont de 3,15 ng/g de lipides et 8,23 ng/g de lipides respectivement dans les cohortes PROTECT et NHANES. Ces données montrent donc la pertinence des doses utilisées dans le modèle développé durant la thèse, au moins pour le PCB153. Il serait donc intéressant, à l'avenir, de quantifier la charge pondérale des polluants dans les matrices biologiques des souris, en récupérant, par exemple, une partie du pelage pour l'analyser ensuite par spectrométrie de masse. L'analyse des poils peut fournir des informations sur une exposition chronique de plusieurs mois, et serait un outil fiable utilisable pour étudier les effets néfastes sur la santé associés à l'exposition aux polluants environnementaux (177).

Conclusion

Ce travail de thèse a permis de mettre au point et de valider un modèle d'étude de la régulation du métabolisme énergétique chez des souris femelles en condition d'ovariectomie et de supplémentation en œstradiol. Nous avons apporté plusieurs éléments de preuve permettant d'améliorer la compréhension de la régulation par les œstrogènes du métabolisme du glucose et des lipides dans le foie, ainsi que de l'adipogenèse et de l'inflammation dans les tissus adipeux.

Dans ce modèle, une exposition chronique à un mélange de polluants environnementaux, à faibles doses, caractérisés comme perturbateurs endocriniens, et n'ayant aucun effet sur le poids, la glycémie, l'insulinémie et la lipémie, peut perturber la signalisation œstrogénique dans les tissus adipeux et le métabolisme des lipides dans le foie. Il est intéressant de noter que le mélange de polluants présente une activité œstrogéno-mimétique chez les souris femelles ovariectomisées exposées depuis le stade *in utero*, suggérant que la période maternelle serait une période de vulnérabilité aux effets des perturbateurs endocriniens.

En raison des faibles doses de polluants utilisées dans le mélange, ces résultats mettent en avant le rôle potentiel des polluants environnementaux dans le développement des maladies métaboliques, et plus particulièrement chez les femmes lors de la transition ménopausique. Cependant, d'autres études sont encore nécessaires afin de mieux comprendre comment le mélange de polluants peut avoir une activité œstrogéno-mimétique, et si cette activité est le résultat d'effets additifs, synergiques ou antagonistes d'un ou de plusieurs polluants du mélange.

Références bibliographiques

1. Diabète [Internet]. [cité 16 mai 2019]. Disponible sur: https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/diabetes

2. Grover SA, Kaouache M, Rempel P, Joseph L, Dawes M, Lau DCW, et al. Years of life lost and healthy life-years lost from diabetes and cardiovascular disease in overweight and obese people: a modelling study. Lancet Diabetes Endocrinol. févr 2015;3(2):114‑22.

3. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. Lancet. 09 2016;387(10027):1513‑30.

4. Obésité et surpoids [Internet]. World Health Organization. [cité 5 sept 2018]. Disponible sur: http://www.who.int.gate2.inist.fr/fr/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight

5. Beck E, Esser N, Paquot N, Scheen AJ. [Metabolically obese normal-weight individuals and metabolically healthy, but obese, subjects]. Rev Med Suisse. 26 août 2009;5(214):1644‑6, 1648‑9.

6. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. Circulation. 25 oct 2005;112(17):2735‑52.

7. DeFronzo RA. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis. Neth J Med. mai 1997;50(5):191‑7.

8. Kao K-T, Sabin MA. Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. Aust Fam Physician. juin 2016;45(6):401‑6.

9. O'Neill HM. AMPK and Exercise: Glucose Uptake and Insulin Sensitivity. Diabetes Metab J. févr 2013;37(1):1‑21.

10. Brown MS, Goldstein JL. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. Cell Metab. févr 2008;7(2):95‑6.

11. Li S, Brown MS, Goldstein JL. Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. Proc Natl Acad Sci USA. 23 févr 2010;107(8):3441‑6.

12. Kim O-K, Jun W, Lee J. Mechanism of ER Stress and Inflammation for Hepatic Insulin Resistance in Obesity. Ann Nutr Metab. 2015;67(4):218‑27.

13. Lafontan M, Langin D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. Prog Lipid Res. sept 2009;48(5):275‑97.

14. Girousse A, Tavernier G, Valle C, Moro C, Mejhert N, Dinel A-L, et al. Partial inhibition of adipose tissue lipolysis improves glucose metabolism and insulin sensitivity without alteration of fat mass. PLoS Biol. 2013;11(2):e1001485.

15. Samuel VT, Shulman GI. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. J Clin Invest. janv 2016;126(1):12‑22.

16. Szendroedi J, Yoshimura T, Phielix E, Koliaki C, Marcucci M, Zhang D, et al. Role of diacylglycerol activation of PKCθ in lipid-induced muscle insulin resistance in humans. Proc Natl Acad Sci USA. 1 juill 2014;111(26):9597‑602.

17. Kumashiro N, Erion DM, Zhang D, Kahn M, Beddow SA, Chu X, et al. Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. Proc Natl Acad Sci USA. 27 sept 2011;108(39):16381‑5.

18. Perry RJ, Camporez J-PG, Kursawe R, Titchenell PM, Zhang D, Perry CJ, et al. Hepatic acetyl CoA links adipose tissue inflammation to hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. Cell. 12 févr 2015;160(4):745‑58.

19. Schoiswohl G, Stefanovic-Racic M, Menke MN, Wills RC, Surlow BA, Basantani MK, et al. Impact of Reduced ATGL-Mediated Adipocyte Lipolysis on Obesity-Associated Insulin Resistance and Inflammation in Male Mice. Endocrinology. oct 2015;156(10):3610‑24.

20. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. Mol Cell Endocrinol. 25 mars 2010;316(2):129‑39.

21. Ertunc ME, Sikkeland J, Fenaroli F, Griffiths G, Daniels MP, Cao H, et al. Secretion of fatty acid binding protein aP2 from adipocytes through a nonclassical pathway in response to adipocyte lipase activity. J Lipid Res. févr 2015;56(2):423‑34.

22. Sun Q, Yang G, Wang H. [The role of tumor necrosis factor alpha and leptin in obesity and insulin resistance]. Zhonghua Nei Ke Za Zhi. juill 2005;44(7):514‑7.

23. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. Science. 28 juill 1995;269(5223):540‑3.

24. Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. Trends Endocrinol Metab. mars 2002;13(2):84‑9.

25. Stefan N, Vozarova B, Funahashi T, Matsuzawa Y, Weyer C, Lindsay RS, et al. Plasma adiponectin concentration is associated with skeletal muscle insulin receptor tyrosine phosphorylation, and low plasma concentration precedes a decrease in whole-body insulin sensitivity in humans. Diabetes. juin 2002;51(6):1884‑8.

26. Ruan H, Dong LQ. Adiponectin signaling and function in insulin target tissues. J Mol Cell Biol. avr 2016;8(2):101‑9.

27. Tomas E, Tsao T-S, Saha AK, Murrey HE, Zhang Cc C cheng, Itani SI, et al. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. Proc Natl Acad Sci USA. 10 déc 2002;99(25):16309‑13.

28. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. Nature. 12 juin 2003;423(6941):762‑9.

29. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. Arterioscler Thromb Vasc Biol. juin 2000;20(6):1595‑9.

30. Iwata M, Hara K, Kamura Y, Honoki H, Fujisaka S, Ishiki M, et al. Ratio of low molecular weight serum adiponectin to the total adiponectin value is associated with type 2 diabetes through its relation to increasing insulin resistance. PLoS One [Internet]. 1 mars 2018 [cité 14 sept 2018];13(3). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5832218/

31. Kadowaki T, Yamauchi T, Okada-Iwabu M, Iwabu M. Adiponectin and its receptors: implications for obesity-associated diseases and longevity. Lancet Diabetes Endocrinol. janv 2014;2(1):8‑9.

32. Yamauchi T, Kadowaki T. Adiponectin receptor as a key player in healthy longevity and obesity-related diseases. Cell Metab. 5 févr 2013;17(2):185‑96.

33. Ye R, Scherer PE. Adiponectin, driver or passenger on the road to insulin sensitivity? Mol Metab. 19 avr 2013;2(3):133‑41.

34. Bjursell M, Ahnmark A, Bohlooly-Y M, William-Olsson L, Rhedin M, Peng X-R, et al. Opposing effects of adiponectin receptors 1 and 2 on energy metabolism. Diabetes. mars 2007;56(3):583‑93.

35. Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, Hada Y, Maki T, Takekawa S, et al. Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. J Biol Chem. 16 juill 2004;279(29):30817‑22.

36. Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, et al. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. Nat Med. mars 2007;13(3):332‑9.

37. Mirza S, Qu H-Q, Li Q, Martinez PJ, Rentfro AR, McCormick JB, et al. Adiponectin/leptin ratio and metabolic syndrome in a Mexican American population. Clin Invest Med. 1 oct 2011;34(5):E290.

38. López-Jaramillo P, Gómez-Arbeláez D, López-López J, López-López C, Martínez-Ortega J, Gómez-Rodríguez A, et al. The role of leptin/adiponectin ratio in metabolic syndrome and diabetes. Horm Mol Biol Clin Investig. avr 2014;18(1):37‑45.

39. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. Cell. 2 mars 2012;148(5):852‑71.

40. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. Science. 2 févr 1996;271(5249):665‑8.

41. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. Nature. 9 oct 1997;389(6651):610‑4.

42. Langin D, Arner P. Importance of TNFalpha and neutral lipases in human adipose tissue lipolysis. Trends Endocrinol Metab. oct 2006;17(8):314‑20.

43. Appari M, Channon KM, McNeill E. Metabolic Regulation of Adipose Tissue Macrophage Function in Obesity and Diabetes. Antioxid Redox Signal. 20 2018;29(3):297‑312.

44. Bourlier V, Zakaroff-Girard A, Miranville A, De Barros S, Maumus M, Sengenes C, et al. Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages. Circulation. 12 févr 2008;117(6):806‑15.

45. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. J Clin Invest. déc 2003;112(12):1821‑30.

46. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. J Clin Invest. juin 2006;116(6):1494‑505.

47. Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, et al. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. J Biol Chem. 8 sept 2006;281(36):26602‑14.

48. Samuel VT, Liu Z-X, Wang A, Beddow SA, Geisler JG, Kahn M, et al. Inhibition of protein kinase Cepsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. J Clin Invest. mars 2007;117(3):739‑45.

49. Raddatz K, Turner N, Frangioudakis G, Liao BM, Pedersen DJ, Cantley J, et al. Time-dependent effects of Prkce deletion on glucose homeostasis and hepatic lipid metabolism on dietary lipid oversupply in mice. Diabetologia. juin 2011;54(6):1447‑56.

50. Magkos F, Su X, Bradley D, Fabbrini E, Conte C, Eagon JC, et al. Intrahepatic diacylglycerol content is associated with hepatic insulin resistance in obese subjects. Gastroenterology. juin 2012;142(7):1444-1446.e2.

51. Færch K, Torekov SS, Vistisen D, Johansen NB, Witte DR, Jonsson A, et al. GLP-1 Response to Oral Glucose Is Reduced in Prediabetes, Screen-Detected Type 2 Diabetes, and Obesity and Influenced by Sex: The ADDITION-PRO Study. Diabetes. juill 2015;64(7):2513‑25.

52. Knauf C, Cani PD, Perrin C, Iglesias MA, Maury JF, Bernard E, et al. Brain glucagon-like peptide-1 increases insulin secretion and muscle insulin resistance to favor hepatic glycogen storage. J Clin Invest. déc 2005;115(12):3554‑63.

53. Mauvais-Jarvis F. Sex differences in metabolic homeostasis, diabetes, and obesity. Biol Sex Differ. 2015;6:14.

54. Ray PF, Conaghan J, Winston RM, Handyside AH. Increased number of cells and metabolic activity in male human preimplantation embryos following in vitro fertilization. J Reprod Fertil. mai 1995;104(1):165‑71.

55. Chen X, McClusky R, Chen J, Beaven SW, Tontonoz P, Arnold AP, et al. The number of x chromosomes causes sex differences in adiposity in mice. PLoS Genet. 2012;8(5):e1002709.

56. Nohara K, Zhang Y, Waraich RS, Laque A, Tiano JP, Tong J, et al. Early-life exposure to testosterone programs the hypothalamic melanocortin system. Endocrinology. avr 2011;152(4):1661‑9.

57. Mauvais-Jarvis F, Arnold AP, Reue K. A Guide for the Design of Pre-clinical Studies on Sex Differences in Metabolism. Cell Metab. 6 juin 2017;25(6):1216‑30.

58. Carr MC. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. J Clin Endocrinol Metab. juin 2003;88(6):2404‑11.

59. Mauvais-Jarvis F. Estrogen and androgen receptors: regulators of fuel homeostasis and emerging targets for diabetes and obesity. Trends Endocrinol Metab. janv 2011;22(1):24‑33.

60. Holinka CF, Diczfalusy E, Coelingh Bennink HJT. Estetrol: a unique steroid in human pregnancy. J Steroid Biochem Mol Biol. mai 2008;110(1‑2):138‑43.

61. Simpson ER. Sources of estrogen and their importance. J Steroid Biochem Mol Biol. sept 2003;86(3‑5):225‑30.

62. Misso ML, Jang C, Adams J, Tran J, Murata Y, Bell R, et al. Adipose aromatase gene expression is greater in older women and is unaffected by postmenopausal estrogen therapy. Menopause. mars 2005;12(2):210‑5.

63. Vrtačnik P, Ostanek B, Mencej-Bedrač S, Marc J. The many faces of estrogen signaling. Biochem Med (Zagreb). 2014;24(3):329‑42.

64. Chabbert Buffet N, Djakoure C, Maitre SC, Bouchard P. Regulation of the human menstrual cycle. Front Neuroendocrinol. juill 1998;19(3):151‑86.

65. Reed MJ, Purohit A, Woo LWL, Newman SP, Potter BVL. Steroid sulfatase: molecular biology, regulation, and inhibition. Endocr Rev. avr 2005;26(2):171‑202.

66. Pasqualini JR. The selective estrogen enzyme modulators in breast cancer: a review. Biochim Biophys Acta. 7 juin 2004;1654(2):123‑43.

67. Raftogianis R, Creveling C, Weinshilboum R, Weisz J. Estrogen metabolism by conjugation. J Natl Cancer Inst Monographs. 2000;(27):113‑24.

68. Garbacz WG, Jiang M, Xie W. Sex-Dependent Role of Estrogen Sulfotransferase and Steroid Sulfatase in Metabolic Homeostasis. Adv Exp Med Biol. 2017;1043:455‑69.

69. Qian YM, Sun XJ, Tong MH, Li XP, Richa J, Song WC. Targeted disruption of the mouse estrogen sulfotransferase gene reveals a role of estrogen metabolism in intracrine and paracrine estrogen regulation. Endocrinology. déc 2001;142(12):5342‑50.

70. Tong MH, Jiang H, Liu P, Lawson JA, Brass LF, Song W-C. Spontaneous fetal loss caused by placental thrombosis in estrogen sulfotransferase-deficient mice. Nat Med. févr 2005;11(2):153‑9.

71. Leiter EH, Chapman HD. Obesity-induced diabetes (diabesity) in C57BL/KsJ mice produces aberrant trans-regulation of sex steroid sulfotransferase genes. J Clin Invest. mai 1994;93(5):2007‑13.

72. Gao J, He J, Shi X, Stefanovic-Racic M, Xu M, O'Doherty RM, et al. Sex-specific effect of estrogen sulfotransferase on mouse models of type 2 diabetes. Diabetes. juin 2012;61(6):1543‑51.

73. Muramatsu M, Inoue S. Estrogen receptors: how do they control reproductive and nonreproductive functions? Biochem Biophys Res Commun. 2 avr 2000;270(1):1‑10.

74. Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, et al. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. J Clin Endocrinol Metab. déc 1997;82(12):4258‑65.

75. Price RH, Butler CA, Webb P, Uht R, Kushner P, Handa RJ. A splice variant of estrogen receptor beta missing exon 3 displays altered subnuclear localization and capacity for transcriptional activation. Endocrinology. mai 2001;142(5):2039‑49.

76. Penot G, Le Péron C, Mérot Y, Grimaud-Fanouillère E, Ferrière F, Boujrad N, et al. The human estrogen receptor-alpha isoform hERalpha46 antagonizes the proliferative influence of hERalpha66 in MCF7 breast cancer cells. Endocrinology. déc 2005;146(12):5474‑84.

77. Faria M, Shepherd P, Pan Y, Chatterjee SS, Navone N, Gustafsson J-Å, et al. The estrogen receptor variants β2 and β5 induce stem cell characteristics and chemotherapy resistance in prostate cancer through activation of hypoxic signaling. Oncotarget. 20 nov 2018;9(91):36273‑88.

78. Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Jones SA, Horne EL, et al. Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. Biochem Biophys Res Commun. 9 juin 1998;247(1):75‑8.

79. Poola I, Abraham J, Baldwin K, Saunders A, Bhatnagar R. Estrogen receptors beta4 and beta5 are full length functionally distinct ERbeta isoforms: cloning from human ovary and functional characterization. Endocrine. août 2005;27(3):227‑38.

80. Williams C, Edvardsson K, Lewandowski SA, Ström A, Gustafsson J-A. A genome-wide study of the repressive effects of estrogen receptor beta on estrogen receptor alpha signaling in breast cancer cells. Oncogene. 7 févr 2008;27(7):1019‑32.

81. Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson J-Å. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. août 2015;29(4):557‑68.

82. Prossnitz ER, Barton M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. Nat Rev Endocrinol. 16 août 2011;7(12):715‑26.

83. Nilsson B-O, Olde B, Leeb-Lundberg LMF. G protein-coupled oestrogen receptor 1 (GPER1)/GPR30: a new player in cardiovascular and metabolic oestrogenic signalling. Br J Pharmacol. juill 2011;163(6):1131‑9.

84. Witte MM, Resuehr D, Chandler AR, Mehle AK, Overton JM. Female mice and rats exhibit species-specific metabolic and behavioral responses to ovariectomy. Gen Comp Endocrinol. 1 mai 2010;166(3):520‑8.

85. Yonezawa R, Wada T, Matsumoto N, Morita M, Sawakawa K, Ishii Y, et al. Central versus peripheral impact of estradiol on the impaired glucose metabolism in ovariectomized mice on a high-fat diet. Am J Physiol Endocrinol Metab. 15 août 2012;303(4):E445-456.

86. Camporez JPG, Jornayvaz FR, Lee H-Y, Kanda S, Guigni BA, Kahn M, et al. Cellular mechanism by which estradiol protects female ovariectomized mice from high-fat diet-induced hepatic and muscle insulin resistance. Endocrinology. mars 2013;154(3):1021‑8.

87. Pae M, Baek Y, Lee S, Wu D. Loss of ovarian function in association with a high-fat diet promotes insulin resistance and disturbs adipose tissue immune homeostasis. J Nutr Biochem. juill 2018;57:93‑102.

88. Stubbins RE, Najjar K, Holcomb VB, Hong J, Núñez NP. Oestrogen alters adipocyte biology and protects female mice from adipocyte inflammation and insulin resistance. Diabetes Obes Metab. janv 2012;14(1):58‑66.

89. Ludgero-Correia A, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Faria TS. Effects of high-fat diet on plasma lipids, adiposity, and inflammatory markers in ovariectomized C57BL/6 mice. Nutrition. mars 2012;28(3):316‑23.

90. Kim W-K, Choi E-K, Sul O-J, Park Y-K, Kim E-S, Yu R, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 deficiency attenuates oxidative stress and protects against ovariectomy-induced chronic inflammation in mice. PLoS ONE. 2013;8(8):e72108.

91. Villa A, Della Torre S, Stell A, Cook J, Brown M, Maggi A. Tetradian oscillation of estrogen receptor α is necessary to prevent liver lipid deposition. Proc Natl Acad Sci USA. 17 juill 2012;109(29):11806‑11.

92. Kamada Y, Kiso S, Yoshida Y, Chatani N, Kizu T, Hamano M, et al. Estrogen deficiency worsens steatohepatitis in mice fed high-fat and high-cholesterol diet. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. déc 2011;301(6):G1031-1043.

93. Benedusi V, Martini E, Kallikourdis M, Villa A, Meda C, Maggi A, et al. Ovariectomy shortens the life span of female mice. Oncotarget. 20 févr 2015;6(13):10801‑11.

94. Médecine Clinique endocrinologie & diabète | Perturbateurs endocriniens et perturbations métaboliques [Internet]. [cité 16 mai 2019]. Disponible sur: https://www.mced.fr/archives/mced/92/perturbateurs-endocriniens-et-perturbations-mtaboliques.html

95. Clegg DJ, Brown LM, Woods SC, Benoit SC. Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. Diabetes. avr 2006;55(4):978‑87.

96. Musatov S, Chen W, Pfaff DW, Mobbs CV, Yang X-J, Clegg DJ, et al. Silencing of estrogen receptor alpha in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. Proc Natl Acad Sci USA. 13 févr 2007;104(7):2501‑6.

97. Langer G, Bader B, Meoli L, Isensee J, Delbeck M, Noppinger PR, et al. A critical review of fundamental controversies in the field of GPR30 research. Steroids. sept 2010;75(8‑9):603‑10.

98. Davis KE, Carstens EJ, Irani BG, Gent LM, Hahner LM, Clegg DJ. Sexually dimorphic role of G protein-coupled estrogen receptor (GPER) in modulating energy homeostasis. Horm Behav. juin 2014;66(1):196‑207.

99. Homma H, Kurachi H, Nishio Y, Takeda T, Yamamoto T, Adachi K, et al. Estrogen suppresses transcription of lipoprotein lipase gene. Existence of a unique estrogen response element on the lipoprotein lipase promoter. J Biol Chem. 14 avr 2000;275(15):11404‑11.

100. Misso ML, Murata Y, Boon WC, Jones MEE, Britt KL, Simpson ER. Cellular and molecular characterization of the adipose phenotype of the aromatase-deficient mouse. Endocrinology. avr 2003;144(4):1474‑80.

101. D'Eon TM, Souza SC, Aronovitz M, Obin MS, Fried SK, Greenberg AS. Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. J Biol Chem. 28 oct 2005;280(43):35983‑91.

102. Meoli L, Isensee J, Zazzu V, Nabzdyk CS, Soewarto D, Witt H, et al. Sex- and age-dependent effects of Gpr30 genetic deletion on the metabolic and cardiovascular profiles of diet-induced obese mice. Gene. 1 mai 2014;540(2):210‑6.

103. Bryzgalova G, Gao H, Ahren B, Zierath JR, Galuska D, Steiler TL, et al. Evidence that oestrogen receptor-α plays an important role in the regulation of glucose homeostasis in mice: insulin sensitivity in the liver. Diabetologia. 1 mars 2006;49(3):588‑97.

104. Ribas V, Nguyen MTA, Henstridge DC, Nguyen A-K, Beaven SW, Watt MJ, et al. Impaired oxidative metabolism and inflammation are associated with insulin resistance in ERalpha-deficient mice. Am J Physiol Endocrinol Metab. févr 2010;298(2):E304-319.

105. Barros RPA, Gabbi C, Morani A, Warner M, Gustafsson J-A. Participation of ERalpha and ERbeta in glucose homeostasis in skeletal muscle and white adipose tissue. Am J Physiol Endocrinol Metab. juill 2009;297(1):E124-133.

106. Barros RPA, Machado UF, Gustafsson J-A. Estrogen receptors: new players in diabetes mellitus. Trends Mol Med. sept 2006;12(9):425‑31.

107. Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Hohmann S, Hartge M, Sprang C, Frost N, et al. Metabolic Actions of Estrogen Receptor Beta (ERβ) are Mediated by a Negative Cross-Talk with PPARγ. PLOS Genetics. 27 juin 2008;4(6):e1000108.

108. Le May C, Chu K, Hu M, Ortega CS, Simpson ER, Korach KS, et al. Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. Proc Natl Acad Sci USA. 13 juin 2006;103(24):9232‑7.

109. Liu S, Le May C, Wong WPS, Ward RD, Clegg DJ, Marcelli M, et al. Importance of extranuclear estrogen receptor-alpha and membrane G protein-coupled estrogen receptor in pancreatic islet survival. Diabetes. oct 2009;58(10):2292‑302.

110. Balhuizen A, Kumar R, Amisten S, Lundquist I, Salehi A. Activation of G protein-coupled receptor 30 modulates hormone secretion and counteracts cytokine-induced apoptosis in pancreatic islets of female mice. Mol Cell Endocrinol. 14 mai 2010;320(1‑2):16‑24.

111. Mårtensson UEA, Salehi SA, Windahl S, Gomez MF, Swärd K, Daszkiewicz-Nilsson J, et al. Deletion of the G protein-coupled receptor 30 impairs glucose tolerance, reduces bone growth, increases blood pressure, and eliminates estradiol-stimulated insulin release in female mice. Endocrinology. févr 2009;150(2):687‑98.

112. Wong WPS, Tiano JP, Liu S, Hewitt SC, Le May C, Dalle S, et al. Extranuclear estrogen receptor-alpha stimulates NeuroD1 binding to the insulin promoter and favors insulin synthesis. Proc Natl Acad Sci USA. 20 juill 2010;107(29):13057‑62.

113. Sharma G, Prossnitz ER. G-Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER) and Sex-Specific Metabolic Homeostasis. Adv Exp Med Biol. 2017;1043:427‑53.

114. Guillette LJ, Gross TS, Masson GR, Matter JM, Percival HF, Woodward AR. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. Environ Health Perspect. août 1994;102(8):680‑8.

115. Woodward AR, Percival HF, Jennings ML, Moore CT. LOW CLUTCH VIABILITY OF AMERICAN ALLIGATORS ON LAKE APOPKA. Florida Scientist. 1993;56(1):52‑63.

116. Home [Internet]. TEDX - The Endocrine Disruption Exchange. [cité 16 mai 2019]. Disponible sur: https://endocrinedisruption.org/home/

117. Bergman Å, Becher G, Blumberg B, Bjerregaard P, Bornman R, Brandt I, et al. Manufacturing doubt about endocrine disrupter science--A rebuttal of industry-sponsored critical comments on the UNEP/WHO report « State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals 2012 ». Regul Toxicol Pharmacol. déc 2015;73(3):1007‑17.

118. Eskenazi B, Warner M, Brambilla P, Signorini S, Ames J, Mocarelli P. The Seveso accident: A look at 40 years of health research and beyond. Environ Int. 2018;121(Pt 1):71‑84.

119. Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, Flaws JA, Nadal A, Prins GS, et al. EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. Endocr Rev. déc 2015;36(6):E1‑150.

120. Le Magueresse-Battistoni B, Labaronne E, Vidal H, Naville D. Endocrine disrupting chemicals in mixture and obesity, diabetes and related metabolic disorders. World J Biol Chem. 26 mai 2017;8(2):108‑19.

121. Chevrier J, Dewailly E, Ayotte P, Mauriège P, Després JP, Tremblay A. Body weight loss increases plasma and adipose tissue concentrations of potentially toxic pollutants in obese individuals. Int J Obes Relat Metab Disord. oct 2000;24(10):1272‑8.

122. Hue O, Marcotte J, Berrigan F, Simoneau M, Doré J, Marceau P, et al. Increased plasma levels of toxic pollutants accompanying weight loss induced by hypocaloric diet or by bariatric surgery. Obes Surg. sept 2006;16(9):1145‑54.

123. Kim M-J, Marchand P, Henegar C, Antignac J-P, Alili R, Poitou C, et al. Fate and complex pathogenic effects of dioxins and polychlorinated biphenyls in obese subjects before and after drastic weight loss. Environ Health Perspect. mars 2011;119(3):377‑83.

124. Calafat AM, Ye X, Wong L-Y, Reidy JA, Needham LL. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. Environ Health Perspect. janv 2008;116(1):39‑44.

125. Völkel W, Colnot T, Csanády GA, Filser JG, Dekant W. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. Chem Res Toxicol. oct 2002;15(10):1281‑7.

126. Koch HM, Lorber M, Christensen KLY, Pälmke C, Koslitz S, Brüning T. Identifying sources of phthalate exposure with human biomonitoring: results of a 48h fasting study with urine collection and personal activity patterns. Int J Hyg Environ Health. nov 2013;216(6):672‑81.

127. Wang W, Leung AOW, Chu LH, Wong MH. Phthalates contamination in China: Status, trends and human exposure-with an emphasis on oral intake. Environ Pollut. juill 2018;238:771‑82.

128. Baravalle R, Ciaramella A, Baj F, Di Nardo G, Gilardi G. Identification of endocrine disrupting chemicals acting on human aromatase. Biochim Biophys Acta Proteins Proteom. janv 2018;1866(1):88‑96.

129. Meerts IA, van Zanden JJ, Luijks EA, van Leeuwen-Bol I, Marsh G, Jakobsson E, et al. Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin in vitro. Toxicol Sci. juill 2000;56(1):95‑104.

130. Lai DY, Kacew S, Dekant W. Tetrabromobisphenol A (TBBPA): Possible modes of action of toxicity and carcinogenicity in rodents. Food Chem Toxicol. juin 2015;80:206‑14.

131. Hwang K-A, Kang N-H, Yi B-R, Lee H-R, Park M-A, Choi K-C. Genistein, a soy phytoestrogen, prevents the growth of BG-1 ovarian cancer cells induced by 17β-estradiol or bisphenol A via the inhibition of cell cycle progression. Int J Oncol. févr 2013;42(2):733‑40.

132. Moriyama K, Tagami T, Akamizu T, Usui T, Saijo M, Kanamoto N, et al. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. J Clin Endocrinol Metab. nov 2002;87(11):5185‑90.

133. Jameera Begam A, Jubie S, Nanjan MJ. Estrogen receptor agonists/antagonists in breast cancer therapy: A critical review. Bioorg Chem. 2017;71:257‑74.

134. Welshons WV, Thayer KA, Judy BM, Taylor JA, Curran EM, vom Saal FS. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. Environ Health Perspect. juin 2003;111(8):994‑1006.

135. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Lee D-H, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. Endocr Rev. juin 2012;33(3):378‑455.

136. Melnick R, Lucier G, Wolfe M, Hall R, Stancel G, Prins G, et al. Summary of the National Toxicology Program’s report of the endocrine disruptors low-dose peer review. Environ Health Perspect. avr 2002;110(4):427‑31.

137. vom Saal FS, Akingbemi BT, Belcher SM, Birnbaum LS, Crain DA, Eriksen M, et al. Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. Reprod Toxicol. sept 2007;24(2):131‑8.

138. Beausoleil C, Emond C, Cravedi J-P, Antignac J-P, Applanat M, Appenzeller BR, et al. Regulatory identification of BPA as an endocrine disruptor: Context and methodology. Mol Cell Endocrinol. 05 2018;475:4‑9.

139. Wei J, Lin Y, Li Y, Ying C, Chen J, Song L, et al. Perinatal exposure to bisphenol A at reference dose predisposes offspring to metabolic syndrome in adult rats on a high-fat diet. Endocrinology. août 2011;152(8):3049‑61.

140. Kang J-H, Kondo F, Katayama Y. Human exposure to bisphenol A. Toxicology. 21 sept 2006;226(2‑3):79‑89.

141. Marmugi A, Ducheix S, Lasserre F, Polizzi A, Paris A, Priymenko N, et al. Low doses of bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver. Hepatology. févr 2012;55(2):395‑407.

142. Newbold RR, Padilla-Banks E, Jefferson WN. Adverse effects of the model environmental estrogen diethylstilbestrol are transmitted to subsequent generations. Endocrinology. juin 2006;147(6 Suppl):S11-17.

143. Fénichel P, Brucker-Davis F, Chevalier N. The history of Distilbène® (Diethylstilbestrol) told to grandchildren--the transgenerational effect. Ann Endocrinol (Paris). juill 2015;76(3):253‑9.

144. Barker DJP, Eriksson JG, Forsén T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. Int J Epidemiol. déc 2002;31(6):1235‑9.

145. Goldoni M, Johansson C. A mathematical approach to study combined effects of toxicants in vitro: evaluation of the Bliss independence criterion and the Loewe additivity model. Toxicol In Vitro. août 2007;21(5):759‑69.

146. Rodea-Palomares I, González-Pleiter M, Martín-Betancor K, Rosal R, Fernández-Piñas F. Additivity and Interactions in Ecotoxicity of Pollutant Mixtures: Some Patterns, Conclusions, and Open Questions. Toxics. 25 sept 2015;3(4):342‑69.

147. Payne J, Rajapakse N, Wilkins M, Kortenkamp A. Prediction and assessment of the effects of mixtures of four xenoestrogens. Environ Health Perspect. oct 2000;108(10):983‑7.

148. Silva E, Rajapakse N, Kortenkamp A. Something from « nothing »--eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. Environ Sci Technol. 15 avr 2002;36(8):1751‑6.

149. Rajapakse N, Silva E, Kortenkamp A. Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action. Environ Health Perspect. sept 2002;110(9):917‑21.

150. Ramirez T, Buechse A, Dammann M, Melching-Kollmuß S, Woitkowiak C, van Ravenzwaay B. Effect of estrogenic binary mixtures in the yeast estrogen screen (YES). Regulatory Toxicology and Pharmacology. 1 oct 2014;70(1):286‑96.

151. Van den Berg M, Birnbaum L, Bosveld AT, Brunström B, Cook P, Feeley M, et al. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. Environ Health Perspect. déc 1998;106(12):775‑92.

152. Delfosse V, Dendele B, Huet T, Grimaldi M, Boulahtouf A, Gerbal-Chaloin S, et al. Synergistic activation of human pregnane X receptor by binary cocktails of pharmaceutical and environmental compounds. Nat Commun. 3 sept 2015;6:8089.

153. Balaguer P, Delfosse V, Grimaldi M, Bourguet W. Structural and functional evidences for the interactions between nuclear hormone receptors and endocrine disruptors at low doses. C R Biol. oct 2017;340(9‑10):414‑20.

154. Fu ZD, Selwyn FP, Cui JY, Klaassen CD. RNA Sequencing Quantification of Xenobiotic-Processing Genes in Various Sections of the Intestine in Comparison to the Liver of Male Mice. Drug Metab Dispos. 2016;44(6):842‑56.

155. Poland A, Glover E, Kende AS. Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. J Biol Chem. 25 août 1976;251(16):4936‑46.

156. Ramadoss P, Perdew GH. The transactivation domain of the Ah receptor is a key determinant of cellular localization and ligand-independent nucleocytoplasmic shuttling properties. Biochemistry. 23 août 2005;44(33):11148‑59.

157. Okey AB. An aryl hydrocarbon receptor odyssey to the shores of toxicology: the Deichmann Lecture, International Congress of Toxicology-XI. Toxicol Sci. juill 2007;98(1):5‑38.

158. Fromenty B. Drug-induced liver injury in obesity. J Hepatol. avr 2013;58(4):824‑6.

159. Timsit YE, Negishi M. CAR and PXR: the xenobiotic-sensing receptors. Steroids. mars 2007;72(3):231‑46.

160. Gonzalez FJ, Peters JM, Cattley RC. Mechanism of action of the nongenotoxic peroxisome proliferators: role of the peroxisome proliferator-activator receptor alpha. J Natl Cancer Inst. 18 nov 1998;90(22):1702‑9.

161. Kota BP, Huang TH-W, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. Pharmacol Res. févr 2005;51(2):85‑94.

162. Waxman DJ, Holloway MG. Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes. Mol Pharmacol. août 2009;76(2):215‑28.

163. Thummel KE, Wilkinson GR. In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1998;38:389‑430.

164. Wang Q, Jia R, Ye C, Garcia M, Li J, Hidalgo IJ. Glucuronidation and sulfation of 7-hydroxycoumarin in liver matrices from human, dog, monkey, rat, and mouse. In Vitro Cell Dev Biol Anim. avr 2005;41(3‑4):97‑103.

165. Weikum ER, Liu X, Ortlund EA. The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. Protein Sci. 2018;27(11):1876‑92.

166. Grün F, Blumberg B. Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. Endocrinology. juin 2006;147(6 Suppl):S50-55.

167. Bertazzi PA, Consonni D, Bachetti S, Rubagotti M, Baccarelli A, Zocchetti C, et al. Health effects of dioxin exposure: a 20-year mortality study. Am J Epidemiol. 1 juin 2001;153(11):1031‑44.

168. Warner M, Mocarelli P, Brambilla P, Wesselink A, Samuels S, Signorini S, et al. Diabetes, metabolic syndrome, and obesity in relation to serum dioxin concentrations: the Seveso women’s health study. Environ Health Perspect. août 2013;121(8):906‑11.

169. Michalek JE, Pavuk M. Diabetes and cancer in veterans of Operation Ranch Hand after adjustment for calendar period, days of spraying, and time spent in Southeast Asia. J Occup Environ Med. mars 2008;50(3):330‑40.

170. Wang S-L, Tsai P-C, Yang C-Y, Guo YL. Increased risk of diabetes and polychlorinated biphenyls and dioxins: a 24-year follow-up study of the Yucheng cohort. Diabetes Care. août 2008;31(8):1574‑9.

171. Lee D-H, Lee I-K, Song K, Steffes M, Toscano W, Baker BA, et al. 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. juill 2006;29(7):1638‑44.

172. Everett CJ, Frithsen IL, Diaz VA, Koopman RJ, Simpson WM, Mainous AG. Association of a polychlorinated dibenzo-p-dioxin, a polychlorinated biphenyl, and DDT with diabetes in the 1999-2002 National Health and Nutrition Examination Survey. Environ Res. mars 2007;103(3):413‑8.

173. Porta M. A strong dose-response relation between serum concentrations of persistent organic pollutants and diabetes: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002: response to Lee et al. Diabetes Care. nov 2006;29(11):2567; author reply 2568.

174. Airaksinen R, Rantakokko P, Eriksson JG, Blomstedt P, Kajantie E, Kiviranta H. Association between type 2 diabetes and exposure to persistent organic pollutants. Diabetes Care. sept 2011;34(9):1972‑9.

175. Gasull M, Pumarega J, Téllez-Plaza M, Castell C, Tresserras R, Lee DH, et al. Blood concentrations of persistent organic pollutants and prediabetes and diabetes in the general population of Catalonia. Environ Sci Technol. 17 juill 2012;46(14):7799‑810.

176. Sun Q, Cornelis MC, Townsend MK, Tobias DK, Eliassen AH, Franke AA, et al. Association of urinary concentrations of bisphenol A and phthalate metabolites with risk of type 2 diabetes: a prospective investigation in the Nurses' Health Study (NHS) and NHSII cohorts. Environ Health Perspect. juin 2014;122(6):616‑23.

177. Appenzeller BMR, Hardy EM, Grova N, Chata C, Faÿs F, Briand O, et al. Hair analysis for the biomonitoring of pesticide exposure: comparison with blood and urine in a rat model. Arch Toxicol. août 2017;91(8):2813‑25.

178. Gauthier M-S, Pérusse JR, Lavoie M-È, Sladek R, Madiraju SRM, Ruderman NB, et al. Increased subcutaneous adipose tissue expression of genes involved in glycerolipid-fatty acid cycling in obese insulin-resistant versus -sensitive individuals. J Clin Endocrinol Metab. déc 2014;99(12):E2518-2528.

179. Ruzzin J, Petersen R, Meugnier E, Madsen L, Lock E-J, Lillefosse H, et al. Persistent Organic Pollutant Exposure Leads to Insulin Resistance Syndrome. Environ Health Perspect. avr 2010;118(4):465‑71.

180. Ibrahim MM, Fjære E, Lock E-J, Naville D, Amlund H, Meugnier E, et al. Chronic Consumption of Farmed Salmon Containing Persistent Organic Pollutants Causes Insulin Resistance and Obesity in Mice. PLoS One [Internet]. 23 sept 2011 [cité 23 mars 2019];6(9). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3179488/

181. Kirchner S, Kieu T, Chow C, Casey S, Blumberg B. Prenatal exposure to the environmental obesogen tributyltin predisposes multipotent stem cells to become adipocytes. Mol Endocrinol. mars 2010;24(3):526‑39.

182. Zuo Z, Chen S, Wu T, Zhang J, Su Y, Chen Y, et al. Tributyltin causes obesity and hepatic steatosis in male mice. Environ Toxicol. févr 2011;26(1):79‑85.

183. Heindel JJ. A special Issue on the environment and Developmental Origins of Health and Diseases. Reprod Toxicol. 2017;68:1‑2.

184. Le Magueresse-Battistoni B, Multigner L, Beausoleil C, Rousselle C. Effects of bisphenol A on metabolism and evidences of a mode of action mediated through endocrine disruption. Mol Cell Endocrinol. 5 nov 2018;475:74‑91.

185. Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, King JC, Soto AM. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. Environ Health Perspect. juill 2001;109(7):675‑80.

186. Rubin BS, Paranjpe M, DaFonte T, Schaeberle C, Soto AM, Obin M, et al. Perinatal BPA exposure alters body weight and composition in a dose specific and sex specific manner: The addition of peripubertal exposure exacerbates adverse effects in female mice. Reprod Toxicol. 2017;68:130‑44.

187. Somm E, Schwitzgebel VM, Toulotte A, Cederroth CR, Combescure C, Nef S, et al. Perinatal exposure to bisphenol a alters early adipogenesis in the rat. Environ Health Perspect. oct 2009;117(10):1549‑55.

188. Wassenaar PNH, Trasande L, Legler J. Systematic Review and Meta-Analysis of Early-Life Exposure to Bisphenol A and Obesity-Related Outcomes in Rodents. Environ Health Perspect. 05 2017;125(10):106001.

189. Alonso-Magdalena P, García-Arévalo M, Quesada I, Nadal Á. Bisphenol-A treatment during pregnancy in mice: a new window of susceptibility for the development of diabetes in mothers later in life. Endocrinology. mai 2015;156(5):1659‑70.

190. Moon MK, Jeong I-K, Jung Oh T, Ahn HY, Kim HH, Park YJ, et al. Long-term oral exposure to bisphenol A induces glucose intolerance and insulin resistance. J Endocrinol. juill 2015;226(1):35‑42.

191. Rubin BS, Schaeberle CM, Soto AM. The Case for BPA as an Obesogen: Contributors to the Controversy. Front Endocrinol (Lausanne). 2019;10:30.

192. Anderson OS, Peterson KE, Sanchez BN, Zhang Z, Mancuso P, Dolinoy DC. Perinatal bisphenol A exposure promotes hyperactivity, lean body composition, and hormonal responses across the murine life course. FASEB J. avr 2013;27(4):1784‑92.

193. Cao J, Echelberger R, Liu M, Sluzas E, McCaffrey K, Buckley B, et al. Soy but not bisphenol A (BPA) or the phytoestrogen genistin alters developmental weight gain and food intake in pregnant rats and their offspring. Reprod Toxicol. déc 2015;58:282‑94.

194. Vom Saal FS. Flaws in design, execution and interpretation limit CLARITY-BPA's value for risk assessments of bisphenol A. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 27 déc 2018;

195. Hao C, Cheng X, Guo J, Xia H, Ma X. Perinatal exposure to diethyl-hexyl-phthalate induces obesity in mice. Front Biosci (Elite Ed). 1 janv 2013;5:725‑33.

196. Strakovsky RS, Lezmi S, Shkoda I, Flaws JA, Helferich WG, Pan Y-X. In utero growth restriction and catch-up adipogenesis after developmental di (2-ethylhexyl) phthalate exposure cause glucose intolerance in adult male rats following a high-fat dietary challenge. J Nutr Biochem. nov 2015;26(11):1208‑20.

197. Pomatto V, Cottone E, Cocci P, Mozzicafreddo M, Mosconi G, Nelson ER, et al. Plasticizers used in food-contact materials affect adipogenesis in 3T3-L1 cells. J Steroid Biochem Mol Biol. 2018;178:322‑32.

198. Hurst CH, Waxman DJ. Activation of PPARalpha and PPARgamma by environmental phthalate monoesters. Toxicol Sci. août 2003;74(2):297‑308.

199. Hao C, Cheng X, Xia H, Ma X. The endocrine disruptor mono-(2-ethylhexyl) phthalate promotes adipocyte differentiation and induces obesity in mice. Biosci Rep. déc 2012;32(6):619‑29.

200. Moody L, Kougias D, Jung PM, Digan I, Hong A, Gorski A, et al. Perinatal phthalate and high-fat diet exposure induce sex-specific changes in adipocyte size and DNA methylation. J Nutr Biochem. mars 2019;65:15‑25.

201. Casals-Casas C, Desvergne B. Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. Annu Rev Physiol. 2011;73:135‑62.

202. Grimaldi M, Boulahtouf A, Delfosse V, Thouennon E, Bourguet W, Balaguer P. Reporter cell lines to evaluate the selectivity of chemicals for human and zebrafish estrogen and peroxysome proliferator activated γ receptors. Front Neurosci. 2015;9:212.

203. Stojanoska MM, Milosevic N, Milic N, Abenavoli L. The influence of phthalates and bisphenol A on the obesity development and glucose metabolism disorders. Endocrine. mars 2017;55(3):666‑81.

204. Kratochvil I, Hofmann T, Rother S, Schlichting R, Moretti R, Scharnweber D, et al. Mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) and mono(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate (MEOHP) but not di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) bind productively to the peroxisome proliferator-activated receptor γ. Rapid Commun Mass Spectrom. 7 août 2018;

205. Lee D-H, Porta M, Jacobs DR, Vandenberg LN. Chlorinated persistent organic pollutants, obesity, and type 2 diabetes. Endocr Rev. août 2014;35(4):557‑601.

206. Le Magueresse-Battistoni B, Vidal H, Naville D. Lifelong consumption of low-dosed food pollutants and metabolic health. J Epidemiol Community Health. juin 2015;69(6):512‑5.

207. Nadal A, Quesada I, Tudurí E, Nogueiras R, Alonso-Magdalena P. Endocrine-disrupting chemicals and the regulation of energy balance. Nat Rev Endocrinol. sept 2017;13(9):536‑46.

208. Naville D, Pinteur C, Vega N, Menade Y, Vigier M, Le Bourdais A, et al. Low-dose food contaminants trigger sex-specific, hepatic metabolic changes in the progeny of obese mice. FASEB J. sept 2013;27(9):3860‑70.

209. Labaronne E, Pinteur C, Vega N, Pesenti S, Julien B, Meugnier-Fouilloux E, et al. Low-dose pollutant mixture triggers metabolic disturbances in female mice leading to common and specific features as compared to a high-fat diet. J Nutr Biochem. juill 2017;45:83‑93.

210. Naville D, Labaronne E, Vega N, Pinteur C, Canet-Soulas E, Vidal H, et al. Metabolic outcome of female mice exposed to a mixture of low-dose pollutants in a diet-induced obesity model. PLoS ONE. 2015;10(4):e0124015.

211. Lin Y, Min L, Huang Q, Chen Y, Fang C, Sun X, et al. The combined effects of DEHP and PCBs on phospholipase in the livers of mice. Environ Toxicol. févr 2015;30(2):197‑204.

212. Lukowicz C, Ellero-Simatos S, Régnier M, Polizzi A, Lasserre F, Montagner A, et al. Metabolic Effects of a Chronic Dietary Exposure to a Low-Dose Pesticide Cocktail in Mice: Sexual Dimorphism and Role of the Constitutive Androstane Receptor. Environ Health Perspect. 2018;126(6):067007.

213. Mulligan C, Kondakala S, Yang E-J, Stokes JV, Stewart JA, Kaplan BLF, et al. Exposure to an environmentally relevant mixture of organochlorine compounds and polychlorinated biphenyls Promotes hepatic steatosis in male Ob/Ob mice. Environ Toxicol. avr 2017;32(4):1399‑411.

214. Shan Q, Huang F, Wang J, Du Y. Effects of co-exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and polychlorinated biphenyls on nonalcoholic fatty liver disease in mice. Environ Toxicol. déc 2015;30(12):1364‑74.

215. Papalou O, Kandaraki EA, Papadakis G, Diamanti-Kandarakis E. Endocrine Disrupting Chemicals: An Occult Mediator of Metabolic Disease. Front Endocrinol (Lausanne) [Internet]. 1 mars 2019 [cité 2 avr 2019];10. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6406073/

216. Riant E, Waget A, Cogo H, Arnal J-F, Burcelin R, Gourdy P. Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. Endocrinology. mai 2009;150(5):2109‑17.

217. Lavoie J-M. Dynamics of hepatic and intestinal cholesterol and bile acid pathways: The impact of the animal model of estrogen deficiency and exercise training. World J Hepatol. 18 août 2016;8(23):961‑75.

218. Tateya S, Tamori Y, Kawaguchi T, Kanda H, Kasuga M. An increase in the circulating concentration of monocyte chemoattractant protein-1 elicits systemic insulin resistance irrespective of adipose tissue inflammation in mice. Endocrinology. mars 2010;151(3):971‑9.

219. Tani A, Yasui T, Matsui S, Kato T, Kunimi K, Tsuchiya N, et al. Different circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 during the menopausal transition. Cytokine. avr 2013;62(1):86‑90.

220. Pervin S, Singh R, Rosenfeld ME, Navab M, Chaudhuri G, Nathan L. Estradiol suppresses MCP-1 expression In vivo : implications for atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. oct 1998;18(10):1575‑82.

221. Arici A, Senturk LM, Seli E, Bahtiyar MO, Kim G. Regulation of monocyte chemotactic protein-1 expression in human endometrial stromal cells by estrogen and progesterone. Biol Reprod. juill 1999;61(1):85‑90.

222. Janis K, Hoeltke J, Nazareth M, Fanti P, Poppenberg K, Aronica SM. Estrogen decreases expression of chemokine receptors, and suppresses chemokine bioactivity in murine monocytes. Am J Reprod Immunol. janv 2004;51(1):22‑31.

223. Bryzgalova G, Lundholm L, Portwood N, Gustafsson J-A, Khan A, Efendic S, et al. Mechanisms of antidiabetogenic and body weight-lowering effects of estrogen in high-fat diet-fed mice. Am J Physiol Endocrinol Metab. oct 2008;295(4):E904-912.

224. Wang HH, Afdhal NH, Wang DQ-H. Overexpression of estrogen receptor alpha increases hepatic cholesterogenesis, leading to biliary hypersecretion in mice. J Lipid Res. avr 2006;47(4):778‑86.

225. Julien B, Pinteur C, Vega N, Labaronne E, Vidal H, Naville D, et al. Evidence for estrogeno-mimetic effects of a mixture of low-dose pollutants in a model of ovariectomized mice. Environ Toxicol Pharmacol. janv 2018;57:34‑40.

226. Naville D, Gaillard G, Julien B, Vega N, Pinteur C, Chanon S, et al. Chronic exposure to a pollutant mixture at low doses led to tissue-specific metabolic alterations in male mice fed standard and high-fat high-sucrose diet. Chemosphere. avr 2019;220:1187‑99.

227. Barouki R, Gluckman PD, Grandjean P, Hanson M, Heindel JJ. Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. Environ Health. 27 juin 2012;11:42.

228. Ilagan Y, Mamillapalli R, Goetz LG, Kayani J, Taylor HS. Bisphenol-A exposure in utero programs a sexually dimorphic estrogenic state of hepatic metabolic gene expression. Reprod Toxicol. 2017;71:84‑94.

229. Foryst-Ludwig A, Kintscher U. Metabolic impact of estrogen signalling through ERalpha and ERbeta. J Steroid Biochem Mol Biol. oct 2010;122(1‑3):74‑81.

230. Wang A, Luo J, Moore W, Alkhalidy H, Wu L, Zhang J, et al. GPR30 regulates diet-induced adiposity in female mice and adipogenesis in vitro. Sci Rep. 04 2016;6:34302.

231. Fagman JB, Wilhelmson AS, Motta BM, Pirazzi C, Alexanderson C, De Gendt K, et al. The androgen receptor confers protection against diet-induced atherosclerosis, obesity, and dyslipidemia in female mice. FASEB J. avr 2015;29(4):1540‑50.

232. Yasrebi A, Rivera JA, Krumm EA, Yang JA, Roepke TA. Activation of Estrogen Response Element-Independent ERα Signaling Protects Female Mice From Diet-Induced Obesity. Endocrinology. 01 2017;158(2):319‑34.

233. Dorne JLCM. Metabolism, variability and risk assessment. Toxicology. 9 févr 2010;268(3):156‑64.

234. Le Magueresse-Battistoni B, Vidal H, Naville D. Environmental Pollutants and Metabolic Disorders: The Multi-Exposure Scenario of Life. Front Endocrinol (Lausanne). 2018;9:582.

235. Brulport A, Le Corre L, Chagnon M-C. Chronic exposure of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces an obesogenic effect in C57BL/6J mice fed a high fat diet. Toxicology. 01 2017;390:43‑52.

236. Czernych R, Chraniuk M, Zagożdżon P, Wolska L. Characterization of estrogenic and androgenic activity of phthalates by the XenoScreen YES/YAS in vitro assay. Environ Toxicol Pharmacol. juill 2017;53:95‑104.

237. Le Fol V, Aït-Aïssa S, Sonavane M, Porcher J-M, Balaguer P, Cravedi J-P, et al. In vitro and in vivo estrogenic activity of BPA, BPF and BPS in zebrafish-specific assays. Ecotoxicol Environ Saf. août 2017;142:150‑6.

238. Doke M, Avecilla V, Felty Q. Inhibitor of Differentiation-3 and Estrogenic Endocrine Disruptors: Implications for Susceptibility to Obesity and Metabolic Disorders. Biomed Res Int. 2018;2018:6821601.

239. Brodowski J, Brodowska A, Laszczyńska M, Chlubek D, Starczewski A. Hormone concentrations in the homogenates of ovarian tissue and blood serum in postmenopausal women not using hormone therapy. Gynecol Endocrinol. mai 2012;28(5):396‑9.

240. Sandanger TM, Sinotte M, Dumas P, Marchand M, Sandau CD, Pereg D, et al. Plasma concentrations of selected organobromine compounds and polychlorinated biphenyls in postmenopausal women of Québec, Canada. Environ Health Perspect. oct 2007;115(10):1429‑34.

241. Rudge CVC, Sandanger T, Röllin HB, Calderon IMP, Volpato G, Silva JLP, et al. Levels of selected persistent organic pollutants in blood from delivering women in seven selected areas of São Paulo State, Brazil. Environ Int. avr 2012;40:162‑9.

242. Watkins DJ, Vélez-Vega CM, Rosario Z, Cordero JF, Alshawabkeh AN, Meeker JD. Preliminary assessment of exposure to persistent organic pollutants among pregnant women in Puerto Rico. Int J Hyg Environ Health. mars 2019;222(2):327‑31.

243. Hong J, Stubbins RE, Smith RR, Harvey AE, Núñez NP. Differential susceptibility to obesity between male, female and ovariectomized female mice. Nutr J. 17 févr 2009;8:11.

244. Huang C-F, Yang C-Y, Chan D-C, Wang C-C, Huang K-H, Wu C-C, et al. Arsenic Exposure and Glucose Intolerance/Insulin Resistance in Estrogen-Deficient Female Mice. Environmental Health Perspectives [Internet]. 10 avr 2015 [cité 20 janv 2017];123(11). Disponible sur: http://ehp.niehs.nih.gov/1408663

245. Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. Proc Natl Acad Sci USA. 7 nov 2000;97(23):12729‑34.

246. Haas E, Bhattacharya I, Brailoiu E, Damjanović M, Brailoiu GC, Gao X, et al. Regulatory role of G protein-coupled estrogen receptor for vascular function and obesity. Circ Res. 13 févr 2009;104(3):288‑91.

247. Jones ME, Thorburn AW, Britt KL, Hewitt KN, Wreford NG, Proietto J, et al. Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. Proc Natl Acad Sci USA. 7 nov 2000;97(23):12735‑40.

248. Howell GE, Mulligan C, Meek E, Chambers JE. Effect of chronic p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) exposure on high fat diet-induced alterations in glucose and lipid metabolism in male C57BL/6H mice. Toxicology. 3 févr 2015;328:112‑22.

249. La Merrill M, Karey E, Moshier E, Lindtner C, La Frano MR, Newman JW, et al. Perinatal exposure of mice to the pesticide DDT impairs energy expenditure and metabolism in adult female offspring. PLoS ONE. 2014;9(7):e103337.

250. Angrish MM, Mets BD, Jones AD, Zacharewski TR. Dietary fat is a lipid source in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-ρ-dioxin (TCDD)-elicited hepatic steatosis in C57BL/6 mice. Toxicol Sci. août 2012;128(2):377‑86.

251. Duval C, Teixeira-Clerc F, Leblanc AF, Touch S, Emond C, Guerre-Millo M, et al. Chronic Exposure to Low Doses of Dioxin Promotes Liver Fibrosis Development in the C57BL/6J Diet-Induced Obesity Mouse Model. Environ Health Perspect. 2017;125(3):428‑36.

252. Arsenescu V, Arsenescu RI, King V, Swanson H, Cassis LA. Polychlorinated biphenyl-77 induces adipocyte differentiation and proinflammatory adipokines and promotes obesity and atherosclerosis. Environ Health Perspect. juin 2008;116(6):761‑8.

253. Wahlang B, Falkner KC, Gregory B, Ansert D, Young D, Conklin DJ, et al. Polychlorinated biphenyl 153 is a diet-dependent obesogen that worsens nonalcoholic fatty liver disease in male C57BL6/J mice. J Nutr Biochem. sept 2013;24(9):1587‑95.

254. Liem AK, Fürst P, Rappe C. Exposure of populations to dioxins and related compounds. Food Addit Contam. avr 2000;17(4):241‑59.

255. Hines EP, White SS, Stanko JP, Gibbs-Flournoy EA, Lau C, Fenton SE. Phenotypic dichotomy following developmental exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA) in female CD-1 mice: Low doses induce elevated serum leptin and insulin, and overweight in mid-life. Mol Cell Endocrinol. 25 mai 2009;304(1‑2):97‑105.

256. Hoppe AA, Carey GB. Polybrominated diphenyl ethers as endocrine disruptors of adipocyte metabolism. Obesity (Silver Spring). déc 2007;15(12):2942‑50.

257. Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, Tokes L, Feldman D. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. Endocrinology. juin 1993;132(6):2279‑86.

258. Wei J, Sun X, Chen Y, Li Y, Song L, Zhou Z, et al. Perinatal exposure to bisphenol A exacerbates nonalcoholic steatohepatitis-like phenotype in male rat offspring fed on a high-fat diet. J Endocrinol. sept 2014;222(3):313‑25.

259. Boucher JG, Gagné R, Rowan-Carroll A, Boudreau A, Yauk CL, Atlas E. Bisphenol A and Bisphenol S Induce Distinct Transcriptional Profiles in Differentiating Human Primary Preadipocytes. PLoS ONE. 2016;11(9):e0163318.

260. Völkel W, Kiranoglu M, Fromme H. Determination of free and total bisphenol A in human urine to assess daily uptake as a basis for a valid risk assessment. Toxicol Lett. 10 juill 2008;179(3):155‑62.

261. Mylchreest E, Cattley RC, Foster PM. Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to Di(n-butyl) phthalate: an antiandrogenic mechanism? Toxicol Sci. mai 1998;43(1):47‑60.

262. Manikkam M, Tracey R, Guerrero-Bosagna C, Skinner MK. Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. PLoS ONE. 2013;8(1):e55387.

263. Kanayama T, Kobayashi N, Mamiya S, Nakanishi T, Nishikawa J. Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor pathway. Mol Pharmacol. mars 2005;67(3):766‑74.

264. Chamorro-García R, Sahu M, Abbey RJ, Laude J, Pham N, Blumberg B. Transgenerational inheritance of increased fat depot size, stem cell reprogramming, and hepatic steatosis elicited by prenatal exposure to the obesogen tributyltin in mice. Environ Health Perspect. mars 2013;121(3):359‑66.

265. Xu C-X, Wang C, Zhang Z-M, Jaeger CD, Krager SL, Bottum KM, et al. Aryl hydrocarbon receptor deficiency protects mice from diet-induced adiposity and metabolic disorders through increased energy expenditure. Int J Obes (Lond). août 2015;39(8):1300‑9.

266. Gao J, He J, Zhai Y, Wada T, Xie W. The constitutive androstane receptor is an anti-obesity nuclear receptor that improves insulin sensitivity. J Biol Chem. 18 sept 2009;284(38):25984‑92.

267. He J, Gao J, Xu M, Ren S, Stefanovic-Racic M, O'Doherty RM, et al. PXR ablation alleviates diet-induced and genetic obesity and insulin resistance in mice. Diabetes. juin 2013;62(6):1876‑87.

268. Jones JR, Barrick C, Kim K-A, Lindner J, Blondeau B, Fujimoto Y, et al. Deletion of PPARgamma in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. Proc Natl Acad Sci USA. 26 avr 2005;102(17):6207‑12.

Annexes

1 Article Chemosphere 2019

Chemosphere 220 (2019) 1187–1199

Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere

Chronic exposure to a pollutant mixture at low doses led to tissue-specific metabolic alterations in male mice fed standard and high-fat high-sucrose diet

Danielle Naville, Guillain Gaillard, Benoit Julien, Nathalie Vega, Claudie Pinteur, Stéphanie Chanon, Hubert Vidal, Brigitte Le Magueresse-Battistoni*

Univ Lyon, CarMeN Laboratory, INSERM U1060, INRA U1397, INSA Lyon, Université Claude Bernard Lyon1, 69600, Oullins, France

HIGHLIGHTS

- Low-dosed pollutants trigger metabolic disturbances in postnatally exposed male mice.
- The mixture of pollutants induced metabolic alterations in a tissue-specific manner.
- Jejunum is highly sensitive with regards to xenobiotic receptors and lipolysis.
- Pollutants have a greatest metabolic impact in standard nutritional conditions.
- Differences in the response to the pollutant mixture were seen between the 2 fat pads.

ARTICLE INFO

Article history:
Received 14 September 2018
Received in revised form
26 November 2018
Accepted 23 December 2018
Available online 26 December 2018

Handling Editor: A. Gies

Keywords:
Mixture of pollutants
Cocktail effect
Endocrine disruptors
High-fat high-sucrose diet
Metabolic disturbances
Obesity

ABSTRACT

Excessive consumption of industrialized food and beverages is a major etiologic factor in the epidemics of obesity and associated metabolic diseases because these products are rich in fat and sugar. In addition, they contain food contact materials and environmental pollutants identified as metabolism disrupting chemicals. To evaluate the metabolic impact of these dietary threats (individually or combined), we used a male mouse model of chronic exposure to a mixture of low-dose archetypal food-contaminating chemicals that was added in standard or high-fat, high-sucrose (HFHS) diet. Specifically, the mixture contained bisphenol A, diethylhexylphthalate, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine and polychlorinated biphenyl 153. Exposure lasted from 5 to 20 weeks of age. Metabolic exploration was conducted setting the basis of candidate gene expression mRNA analyses in liver, jejunum and adipose tissue depots from 20 week-old mice. Strong metabolic deleterious effects of the HFHS diet were demonstrated in line with obesity-associated metabolic features and insulin resistance. Pollutant exposure resulted in significant changes on plasma triglyceride levels and on the expression levels of genes mainly encoding xenobiotic processing in jejunum; estrogen receptors, regulators of lipoprotein lipase and inflammatory markers in jejunum and adipose tissues as well as adipogenesis markers. Importantly, the impact of pollutants was principally evidenced under standard diet. In addition, depending on nutritional conditions and on the metabolic tissue considered, the impact of pollutants could mimic or oppose the HFHS effects. Collectively, the present study extends the cocktail effect concept of a low-dosed pollutant mixture and originally points to tissue-specificity responsiveness especially in jejunum and adipose tissues.

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

According to WHO (World Health Organization), obesity is an "abnormal or excessive fat accumulation that presents a risk to health". This accumulation of fat is deleterious because it could lead to a large spectrum of metabolic diseases (type 2 diabetes, cardiovascular diseases …) which are among the first causes of mortality with 10 million deaths in 2016. For example, more than 1.9 billion of adults in 2016, 18 years and older, were overweight, of those over 650 million were obese (WHO, 2018a, b). Diabetes also exploded these last decades with an average of 400 million worldwide in 2014 (WHO, 2017). In addition, metabolic disorders

* Corresponding author.
E-mail address: brigitte.lemagueresse@inserm.fr (B. Le Magueresse-Battistoni).

https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.177
0045-6535/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

constitute a heavy cost for society. For example, worldwide cost of diabetes caring exceeded $673 billion in 2015 (WHO, 2016).

Metabolic disorders are multifactorial diseases. Apart from genetic susceptibility and low physical activity, environmental concern relates to excessive consumption of industrialized food and beverages for their content in fat and sugar but also food contact materials and environmental pollutants. Food contact materials may include phthalates and bisphenols which can leach from packaging to cause contamination (Startin et al., 1987; Vandenberg et al., 2007; Koch and Calafat, 2009; Muncke, 2009). Environmental pollutants include persistent pollutants such as dioxins or polychlorobiphenyls (PCBs) which are lipophilic and bioaccumulate through the food chain being virtually present in all animal products (Schafer and Kegley, 2002).

Importantly, risk assessment evaluation bodies e.g., the European Food Safety Authority (EFSA) or the U.S. Food and Drug administration (FDA) focused primarily on single chemicals with the definition of tolerable daily intake (TDI) doses based on the no-observed-adverse effect levels (NoAELs) or the lowest-adverse-effect levels in animal studies (Dorne, 2010). Consistently, the mean exposures for the general population were found to be below the current levels determined to be safe for chemicals (Schafer and Kegley, 2002; Koch and Calafat, 2009). However, a recent concern arose with chemicals possibly acting at doses lower than the NoAEL doses identified in animal studies and for some chemicals in the range of the TDI doses (Vandenberg et al., 2007, 2012), and interfering with hormonal action, the so-called endocrine disruptors (Zoeller et al., 2014).

There are more than 900 molecules present in our environment that could be considered as endocrine disruptors (EDs) (WHO/UNEP, 2013) and to which we are non-voluntary but chronically exposed. Individually, their concentration may be too low to exert an effect but through acting on identical biological outcomes, the resulting effects of mixtures may grow as significant, an event now identified as the cocktail effect (Kortenkamp, 2014; Svingen and Vinggaard, 2016; Le Magueresse-Battistoni et al., 2017; Le Magueresse-Battistoni et al., 2018a). It is therefore of striking importance to further implement the metabolic impact of mixtures of pollutants at dosage lower than their NoAEL determined in animal studies.

Interestingly, we recently developed a mouse model of exposure to four pollutants (Naville et al., 2013, 2015; Labaronne et al., 2017; Julien et al., 2018) selected among archetypal EDs. Specifically, the mixture is made of two persistent pollutants, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-pdioxine (TCDD) and Polychlorinated Biphenyl 153 (PCB153) and two non-persistent pollutants, Bisphenol A (BPA) and diethylhexylphthalate (DEHP). These pollutants were chosen as an attempt to mimic a real-world exposure based on persistence with two short-lived and two persistent molecules, on their large occurrence in a Western-diet, on the broad range of signaling pathways activated not to mention the many cross-talks occurring between them (Casals-Casas and Desvergne, 2011; Thayer et al., 2012; Vandenberg et al., 2012). In addition, they are considered as metabolism disrupting chemicals (Casals-Casas and Desvergne, 2011; Heindel et al., 2017). Notably, BPA whom worldwide production reached millions of tons yearly and which is mainly used in the manufacture of plastics and resins, has been well identified as triggering metabolic disturbances acting among others through estrogeno-mimetic activities (Alonso-Magdalena et al., 2011; Vandenberg et al., 2012; Vom Saal et al., 2012; Beausoleil et al., 2018; Le Magueresse-Battistoni et al., 2018b). Phthalates are massively produced to soften plastics. They have been described as anti-androgenic compounds although not acting through binding the Androgen Receptor (AR) (Schug et al., 2011). PCB153 and TCDD (also known as the Seveso Dioxin) are persistent with a very long half-life and they bioaccumulate in the fat (Casals-Casas and Desvergne, 2011). Dioxins act through binding to the Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) and PCB153, which could bind the Pregnane X and Constitutive Androstane Receptors (PXR and CAR, respectively) but not AhR, may interfere with thyroid but also estrogen signaling (Diamanti-Kandarakis et al., 2009; Casals-Casas and Desvergne, 2011; Pavek, 2016) to mediate their metabolism disrupting effects (Angrish et al., 2012; Wahlang et al., 2013; Heindel et al., 2017). Noteworthy, diet is the major route of exposure for pollutants including those present in the mixture used in the present study (Diamanti-Kandarakis et al., 2009; Casals-Casas and Desvergne, 2011; Thayer et al., 2012; Vandenberg et al., 2012).

With this model, we demonstrated that chronic exposure to such a mixture at dosage lower than the NoAELs for each chemical of the mixture, could trigger metabolic disturbances in the progeny of diet-induced obese mice in a sex-dependent way (Le Magueresse-Battistoni et al., 2018c). Importantly, male mice developed alterations in cholesterol metabolism whereas females exhibited altered glucose tolerance, probably linked to reduced estrogen signaling in the liver, all occurring without additional obesogenic effects (Naville et al., 2013). As a step further, the present study aims to evaluate the metabolic impact of two challenging stressors, *i.e.* the high-fat high-sucrose (HFHS) diet and the mixture of pollutants, independently and combined, focusing on males in a one-generation study. Consistently, we analyzed the liver and the intestine, specifically the jejunum, because these two organs play pivotal roles in detoxification processes and in glucose and lipid metabolisms. In addition, the jejunum is a predominant organ for dietary fat and sugar absorption. Adipose tissues were also surveyed as they play a major role in the development of insulin resistance.

2. Materials and methods

2.1. Diet and animals

Mouse studies were performed with the approval of the Regional Committee of Ethics for Animal Experiments. Thirty-two C57Bl/6J male mice were purchased from Envigo (Gannat, France) at the age of 4 weeks (wks) and were housed two per cage at 21 °C with a normal light-dark cycle and free access to water. Cages and bottles of water were made of polypropylene to avoid BPA leaching from polycarbonate equipment. After 1 wk-acclimatization, mice were divided into four groups depending on the diet: ST0 (standard diet from Genestil, Royaucourt, France; without the mixture of pollutants), STp (standard diet with the mixture of pollutants), HF0 (HFHS diet from Envigo, without the mixture of pollutants) and HFp (HFHS diet with the mixture of pollutants). Pollutants (TCDD from LGC-Promochem, Molsheim, France; PCB153, BPA and DEHP from Sigma-Aldrich, Lyon, France) were each used at doses in the range of their tolerable daily intake (TDI) reference dose and at least 10 times lower than their NoAEL dose (van Leeuwen et al., 2000; WHO, 2003; European Food Safety Authority Panel on Food Additives, 2005) (Supplementary Table 1). They were diluted in DMSO, solubilized in corn oil and mixed into the diet. All animals received the same amount of DMSO and corn oil. To make sure mice received the adequate quantity of pollutants, calculations for doses were made for 1 g of food for 17 g of body weight/day and extra food devoid of pollutants but containing vehicle was given *ad libitum*. Diet composition is detailed elsewhere (Labaronne et al., 2017). Mice were weighed weekly and food changed three times a week. Exposure to pollutants lasted 15 wks after which animals were fasted for 6 h and weighed. Blood was collected and mice euthanized by cervical dislocation. The organs: liver, jejunum, perigonadal and inguinal subcutaneous adipose tissues (pgAT and

scAT, respectively) were rapidly removed, weighed, frozen in liquid nitrogen and conserved at −80 °C until experiments.

2.2. Metabolic explorations

Metabolic tests were conducted on all animals with a 1 wk interval. After 12 wks of diet, mice were fasted for 16 h and received an intragastric bolus of lipids (250 µl of Isio4™ oil, Lesieur). Blood samples were collected from the tail vein before gavage and at 1, 2, 3 and 4 h after gavage for triglyceride measurement. This test will reflect the intestinal fat clearance. After 13 wks of diet, mice were fasted 6 h and were orally administered a solution of 10% D-xylose (1 mg of D-xylose/g of body weight). Blood samples were collected at 20, 40, 60 and 120 min after gavage for xylose measurement. This exploration of the intestinal uptake of ingested D-xylose will mirror a post-prandial sugar uptake. After 14 wks of diet, glucose tolerance test (GTT) was performed on 6 h fasted mice as previously described (Gout et al., 2010).

2.3. Tissue and plasma dosages

Blood glucose concentrations were determined using the Accu-Chek Performa glucometer (Roche Diabetes Care France, Meylan). Insulin (Mouse ultrasensitive ELISA, Eurobio, Courtaboeuf, France), triglycerides (Biolabo, Maizy, France), free fatty acid, total cholesterol and cholesteryl esters, Alanine Aminotransferase and Aspartate aminotransferase activities (all kits from Sigma-Aldrich), leptin and adiponectin (ELISA kits from Crystal Chem Europe, Zaandam, Netherlands), were also assayed in plasma. Xylose plasma levels were determined as described elsewhere (Conarello et al., 2007). Triglycerides and total cholesterol were also measured in liver samples after extraction of the lipids using lipid extraction kit chloroform free (Clinisciences, Nanterre, France).

2.4. Real time PCR analyses

Total RNA was extracted from liver, jejunum and adipose tissue samples. After reverse transcription using the Prime Script RT Reagent kit (Takara Bio Europe SAS, Saint-Germain-en-Laye, France), cDNAs were analyzed by real time PCR using the SYBR Premix Ex Taq ™ (Takara) in the presence of specific primers specifically designed to encompass an intron (Supplementary Table 2) as previously described (Naville et al., 2011). Data were normalized using housekeeper genes which differ according to the tissues. They were chosen because consistently expressed in all groups in a particular tissue and they encode TATA-Box Binding Protein (*Tbp*) for scAT and pgAT, Beta-Glucuronidase (*Gusb*), for the liver, and Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase (*Hprt*) for the jejunum.

2.5. Histological analyses

The two adipose tissue depots were fixed with 4% formaldehyde solution during 24 h and then paraffin embedded. Serial sections of the paraffin-embedded blocks (4 µm thick) were obtained and immunolabeled using the rabbit anti-laminin antibody (1:100, Sigma, L9393) followed by alexafluor secondary antibody (Invitrogen, Villebon-sur-Yvette, France; A11012). Measurement of adipocyte area was performed from the immunofluorescence acquisition using DP74 camera (Olympus, France). At least 150 adipocytes for each sample were considered. Image analyses were performed with ImageJ software.

2.6. Statistical analysis

Results are presented as means ± SEM. Groups were compared using one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison post-hoc test. Two-way ANOVA for non-repeated measures was also used to determine the overall effects of the diet (Standard ST0/STp *vs* HFHS HF0/HFp), the mixture (non-exposure ST0/HF0 vs exposure STp/HFp) and their interaction (diet x mixture). When significant effects without interaction were obtained, differences were tested using Student's t-test between each pollutant-exposed group and corresponding non-exposed group. GraphPad Prism 5.0 software was used for all statistical analysis and differences were considered significant at P - values < 0.05.

3. Results

3.1. Metabolic characterization of males fed the HFHS versus the ST diet, containing or not the mixture of pollutants

Feeding 5-wk old male mice a HFHS diet for 15 wks resulted in a time-dependent increase of body weight with first significant effects observed at 8 wks of age i.e. wk 3 of feeding (Supplementary Fig. 1A). At the end of the 15-wk HFHS feeding, strong significant diet-induced obesogenic effects were reported on body weight (+38%) and fat mass (+250% for pgAT weight and +380% for scAT weight) (Fig. 1A and B). This was associated with significant increases of hepatic and plasma triglycerides (TG), plasma cholesterol and blood glucose levels (Fig. 1D, F and Supplementary Fig. 1D). An overall effect of the diet was also noticed on plasma insulin level (Fig. 1D) resulting in a 4.5-fold significant enhancement of the HOMA index of insulin resistance (HOMA-IR; Supplementary Fig. 1E). Moreover, the ratio of adiponectin to leptin, a marker of insulin resistance (Mirza et al., 2011; Lopez-Jaramillo et al., 2014), was strongly decreased in HFHS-fed mice (Fig. 1E and Supplementary Fig. 1F). These data are consistent with the metabolic tests performed on fasting animals showing a significant decrease in blood lipid clearance (increased Area Under Curve, AUC, after oral lipid load) and increased glucose absorption (estimated using the xylose absorption test) as well as glucose intolerance in HFHS diet-induced obese mice (Fig. 1C and Supplementary Figs. 1B and C).

Pollutant exposure did not result in body weight changes regardless of the nutritional context. Interestingly, slight but significant effects ($P < 0.05$) of the mixture of pollutants could be observed in STp-fed mice on several features including an increase of the intestinal fat clearance after oral lipid load, a significant reduction in plasma levels of TG with a tendency ($P = 0.05$) to a reduction of plasma FFA levels and a significant increased ratio of adiponectin to leptin, all seemingly and unexpectedly converging to some alleviation of metabolic conditions (Fig. 1C, E, F and Supplementary Fig. 1F). On the opposite, mice exposed to the mixture of pollutants and fed a HFHS diet exhibited a significant enhancement of the weight of pgAT as compared to HF0 mice (Fig. 1B), in line with the observed trend ($P = 0.08$) for enhanced leptin plasma levels (Supplementary Fig. 1F).

3.2. Gene expression analysis of proteins involved in lipid metabolism in the liver

As an attempt to better comprehend the metabolic features, we first focused on liver, a central regulator of lipid metabolism and detoxification. Potential toxicity linked to pollutant exposure was first excluded through measuring plasma transaminases. Indeed, both AST and ALT levels were unchanged regardless of treatment (Supplementary Fig. 2). To understand bases for the alleviation of the lipid profile in pollutant-exposed STp mice compared with ST0 mice (Fig. 1C and F), measurement of the expression levels of genes involved in the uptake of circulating fatty acids, *de novo* lipogenesis,

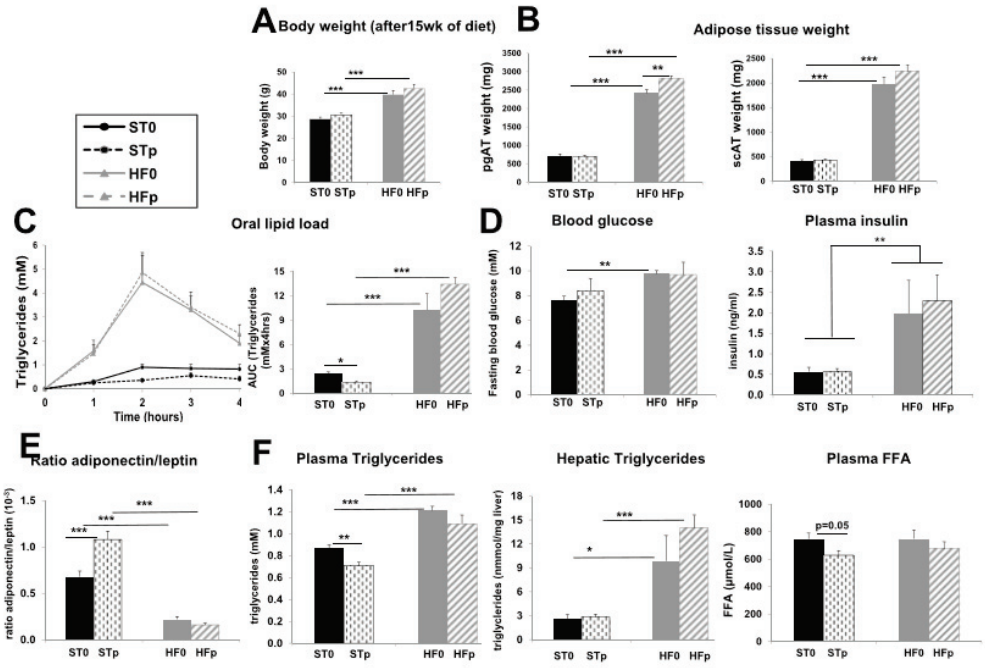


Fig. 1. (A) Body weight measured at the end of the protocol (after 6 h of fasting). **(B)** Weight of perigonadal and subcutaneous adipose tissues (pgAT and scAT) at the end of the protocol. **(C)** Tests performed after 12 wks of diet (Oral lipid load expressed as differences of triglyceride levels from time 0 and corresponding AUC) **(D–F)** Biochemical parameters: Blood glucose and plasma insulin **(D)**; adponectin/leptin ratio **(E)**; plasma and hepatic Triglycerides; plasma Free Fatty Acids (FFA) **(F)**. Values are means ± SEM with n = 8. ***P < 0.001; **P < 0.01; *P < 0.05.

fatty acid breakdown, lipoprotein metabolism and lipolysis as well as cholesterol homeostasis was conducted in liver. Specifically, studied genes included *Cd36* encoding cluster of differentiation 36 and *Fabp1* encoding fatty acid binding protein 1 involved in the uptake of FA, the lipid sensor Nr1h3 encoding Liver X receptor (LXR)α, *SrebF1* encoding Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1 (SREBP1c), a master regulator of *de novo* lipogenesis, *Scd1* and *Acaca* encoding stearoyl-CoA desaturase and acetyl-CoA carboxylase (ACC1), respectively. Lipid oxidation was assessed measuring mRNA levels of *Nr1c1* (encoding peroxisome proliferator-activated receptor α, PPARα), its target genes *Cpt1a* (encoding carnitine palmitoyltransferase 1α) and *Vnn1* (encoding Vanin-1). Expression levels of *Apoa5* encoding Apolipoprotein A-V (APOA-V) a lipoprotein lipase (LPL) activator and *Apoc3*, encoding an inhibitor of LPL (APO-C III) were as well studied so were several key genes involved in cholesterol metabolism: *Cyp7a1*, *Hmgcr*, *Cyp51*, *Abcg5*, *Abcg8*, *Abca1* encoding Cytochrome P450 Family 7 Subfamily A Member 1, 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase (HMGCoAR), P450 sterol 14a-demethylase and ATP-binding cassette (ABC) transporters, respectively.

On this panel of genes, effects observed in the liver were essentially due to the HFHS diet (comparison HF0 *vs* ST0) with significant increases of *Cd36*, *SrebF1*, *Scd1* (Fig. 2A, C), *Nr1c1*, *Vnn1* (Fig. 2D) and *Cyp7a1* (Fig. 2E) expressions. As well, the fat-enriched diet induced a decrease in the expression of *Apoa5* (Fig. 2B), *Hmgcr*, *Cyp51* (Fig. 2E) and *Abcg5*, but not of *Abcg8*, *Abca*, *Nr1h3* and *Fabp1* (data not shown). It is interesting to note that some alterations of gene expression induced by the fat-enriched diet were only observed in the presence of pollutants: decreased expression of *Acaca* and increased expression of *Apoc3*. As well, pollutants in a standard diet context significantly increased the mRNA expression of *Cyp7a1* (Fig. 2E). However, no effect of the pollutant mixture was observed on the other investigated genes of the cholesterol field area including *Hmgcr*, *Cyp51* (Fig. 2E), *Nr1h3* as well as *Abcg5*, *Abcg8* and *Abca1* (data not shown).

To discriminate between hepatic steatosis and steatohepatitis, a more severe liver disease than fatty liver characterized by a chronic inflammatory state with high levels of cytokines among which IL6 and tumor necrosis factor (TNF)α (Tilg and Moschen, 2008; Chen et al., 2017), expression levels of *Il6* and *Tnfα* were surveyed but no impact was observed regardless of treatments (Fig. 2F). Nonetheless, *Ccl2* encoding the chemokine monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1/CCL2) which levels could be increased from simple steatosis (Greco et al., 2008) were found significantly enhanced by the HFHS diet (Fig. 2F).

3.3. Gene expression analysis of proteins involved in lipid absorption and metabolism in jejunum

In the present study, dietary fat and glucose absorption were shown impacted by the nutritional stressors tested e.g., HFHS diet and/or the pollutant mixture (Fig. 1 and Supplemental Fig. 1). Inasmuch as the jejunum is a predominant site for these functions, we analyzed the expression levels of jejunal genes involved in the

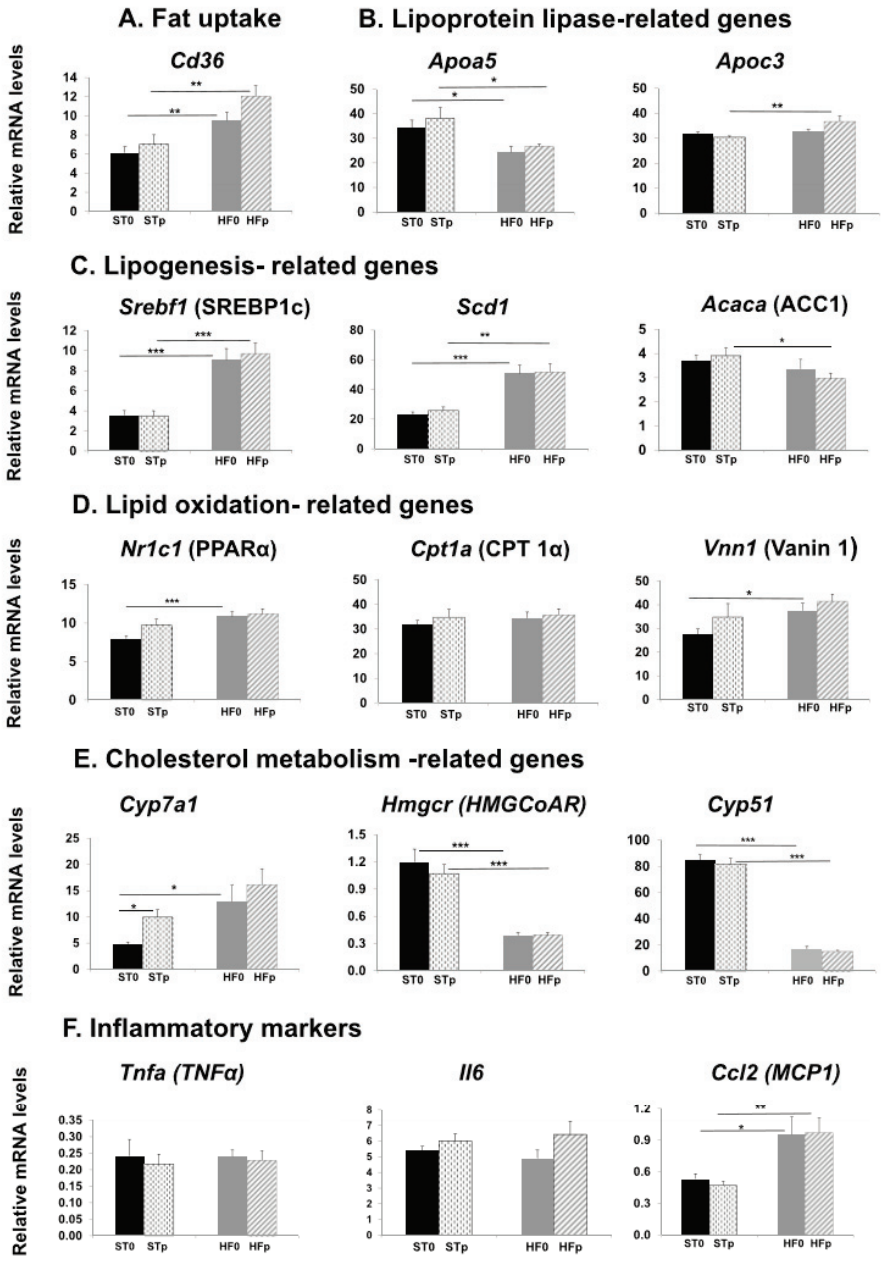


Fig. 2. Effect of the HFHS diet and the mixture of pollutants on the hepatic expression of genes related to Fat uptake **(A)**, Lipoprotein lipase **(B)**, lipogenesis **(C)**, lipid oxidation **(D)**, cholesterol homeostasis **(E)** and inflammation **(F)**. Values are means ± SEM with n = 8. ***P < 0.001; **P < 0.01; *P < 0.05.

absorption of fatty acids including *Got2* (encoding Plasma membrane Fatty Acid Binding Protein, FABPpm), *Cd36* and *Slc27a4* (encoding Fatty Acid Transport Protein 4, FATP4). Expression of genes involved in the cholesterol metabolism: *Npc1l1* gene (encoding Niemann Pick C1 Like-1, NPC1L1) and the lipoprotein biosynthesis: *Sar1b* (encoding Secreted associated Ras related GTPase 1B, SAR1B) and *Mttp* (encoding Microsomal Triglyceral Transfert Protein, MTP) were also investigated, together with the anti-inflammatory marker *Il10* encoding the interleukin IL10.

The HFHS diet (HF0 *vs* ST0) altered the expression of *Got2* and *Cd36* (increased expression, Fig. 3A) as well as *Npc1l1* (decreased expression, Fig. 3B). The pollutant mixture had no significant effect in a context of a standard diet but it has to be noted that *Slc27a4* and *Mttp* expressions were only significantly modified by the HFHS diet in a context of pollutant exposure (Fig. 3A and C).

The expression of genes encoding inhibitors of the lipoprotein lipase (LPL) enzyme responsible for blood chylomicron clearance: *Angptl4* and *Apoc3* encoding Angiopoietin-Like 4 (ANGPTL4) and Apolipoprotein-CIII (APO-CIII), respectively, were also studied. Feeding HFHS diet resulted in a significant enhancement of *Apoc3* and *Angptl4* mRNA levels both in the absence or presence of pollutants (Fig. 3D). Of note, exposure to pollutants resulted in a significant down-regulation of *Apoc3* mRNA and a downward trend for *Angptl4* ($P = 0.09$) in ST fed mice only (Fig. 3D). Interestingly pollutants induced a significant decrease in the *Il10* expression at the mRNA level (Fig. 3E) in a context of standard diet and an inverse effect in the context of HFHS diet (Fig. 3E).

Eventually, we found that genes involved in intestinal glucose transport and sensing such as *Slc2a2* and *Slc5a1* (encoding the proteins Glucose Transporter 2, GLUT2 and sodium-dependent glucose cotransporter SGLT1, respectively) (Roder et al., 2014) were expressed at similar levels between groups (data not shown).

3.4. Gene expression analysis of proteins involved in adipocyte differentiation

As a next step, we analyzed genes related to adipogenesis including *Nr1c3* encoding peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)γ, a master regulator of adipocyte differentiation; *Fabp4* encoding Fatty Acid Binding Protein (FABP4), and *Cidec* encoding Cell Death Inducing DFFA Like Effector C (CIDEC). Importantly, the two different ATs studied herein responded differently to nutritional stressors. While in scAT, *Fabp4* and *Cidec* mRNA levels were significantly enhanced in response to HFHS diet, they remained unchanged in pgAT (Figs. 4A and 5A). Conversely, *Nr1c3* mRNA levels remained unchanged in scAT from HF0 *vs* ST0

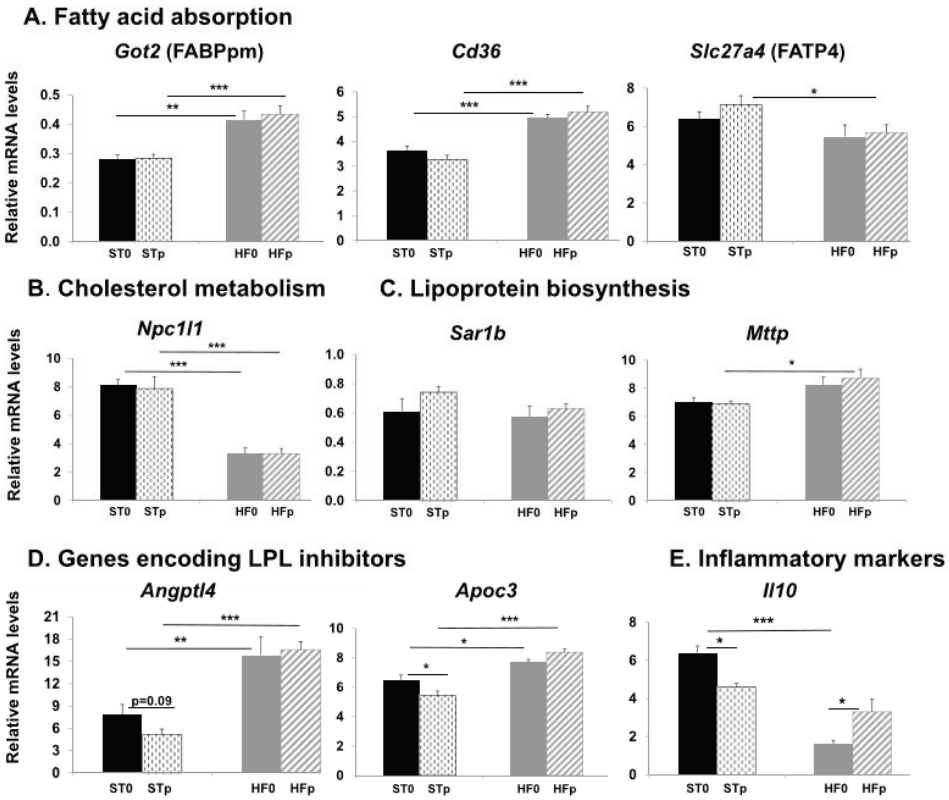


Fig. 3. Effect of the HFHS diet and the mixture of pollutants on the jejunum expression of genes related to Fatty Acid absorption **(A)**, cholesterol metabolism **(B)**, lipoprotein biosynthesis **(C)**, and encoding LPL inhibitors **(D)** or inflammatory markers **(E)**. Values are means ± SEM with n = 8. ***P < 0.001; **P < 0.01; *P < 0.05.

mice (Fig. 4A) but were significantly reduced in pgAT (Fig. 4A). These distinct features were also observed for genes involved in TG metabolism including *Pnpla2* encoding Adipose Triglyceride Lipase (ATGL); *Lipe* encoding Hormone-Sensitive Lipase (HSL); and *Lpl* encoding Lipoprotein Lipase (LPL). While *Pnpla2* mRNA levels remained unchanged in scAT, they were strongly decreased after HF feeding in pgAT (Figs. 4B and 5B). On the contrary, an enhanced expression of *Lipe* and *Lpl* was induced by the HFHS diet in scAT while no change was observed in pgAT (Figs. 4B and 5B).

Pollutants also targeted scAT differently than pgAT. There was a significantly enhanced expression of *Cidec* and *Lipe* and a trend to an enhanced expression of *Nr1c3*, *Fabp4* ($P = 0.07$) and *Lpl* ($P = 0.06$) in scAT from STp mice as compared to ST0 mice (Fig. 4A and B) but no significant effect was observed in a context of HFHS

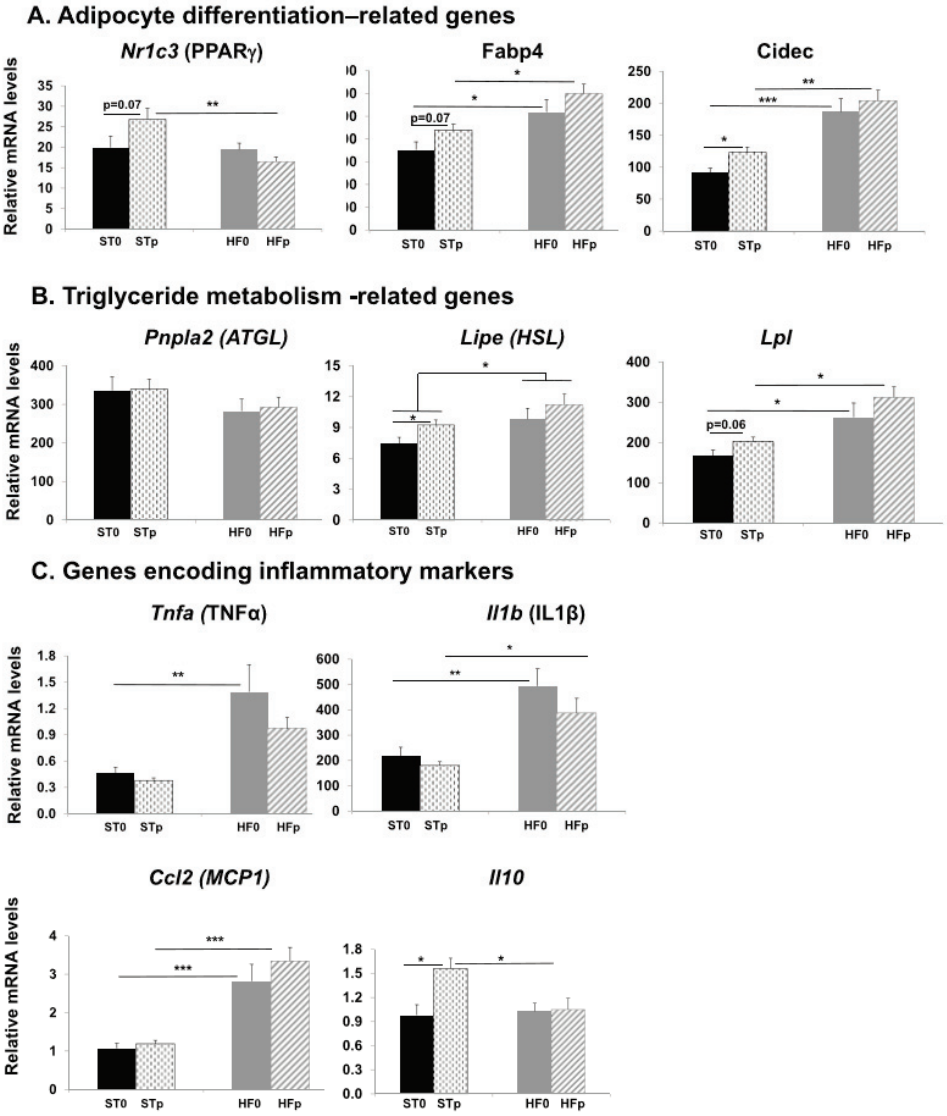


Fig. 4. Effect of the HFHS diet and the mixture of pollutants on the scAT expression of genes related to adipocyte differentiation **(A)**, triglyceride metabolism **(B)** or encoding inflammatory markers **(C)**. Values are means ± SEM with n = 8. ***P < 0.001; **P < 0.01; *P < 0.05.

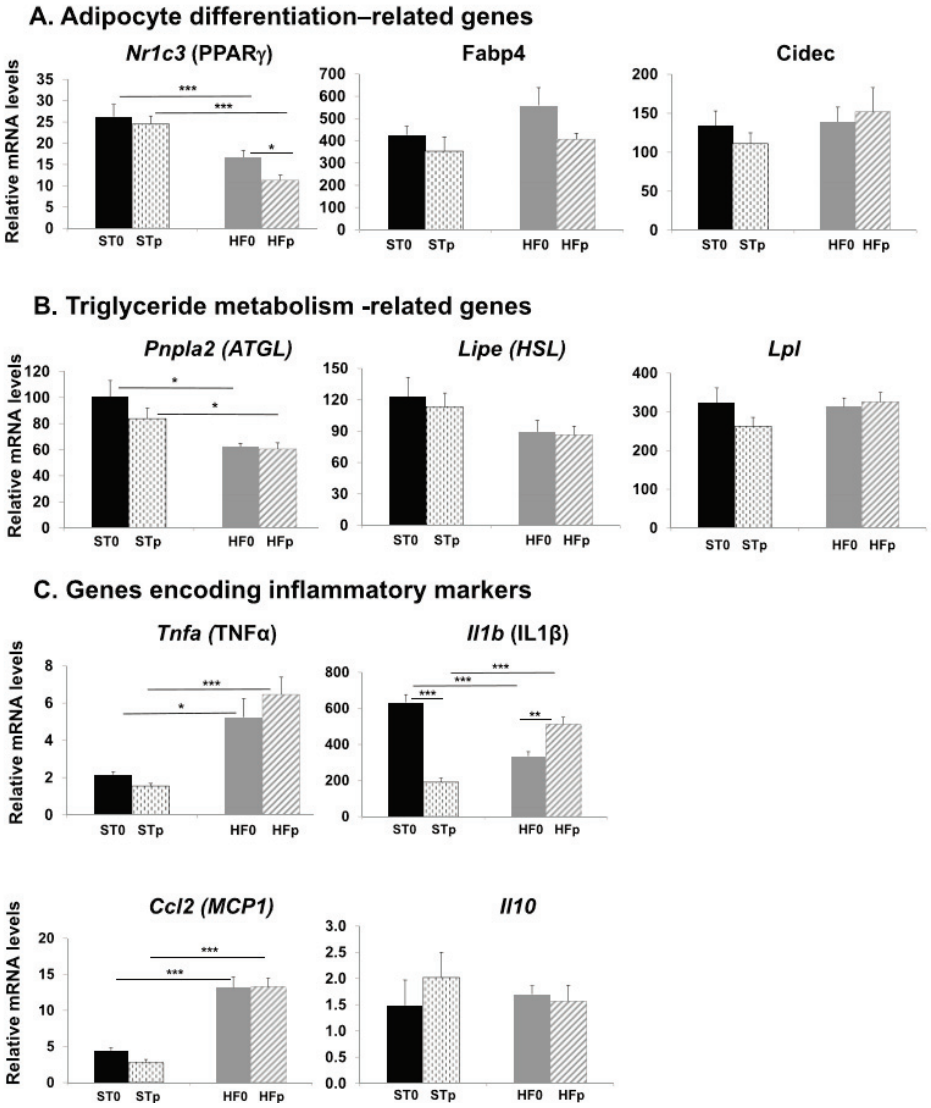


Fig. 5. Effect of the HFHS diet and the mixture of pollutants on the pgAT expression of genes related to adipocyte differentiation **(A)**, triglyceride metabolism **(B)** or encoding inflammatory markers **(C)**. Values are means ± SEM with n = 8. ***P < 0.001; **P < 0.01; *P < 0.05.

diet. Conversely, the pollutant effects in pgAT were observed in a context of HFHS diet with a significant decrease of *Nr1c3* mRNA levels in HFp versus HF0 samples (Fig. 5A).

To complete the study, histological analyses were performed on both subcutaneous and perigonadal ATs. Consistent with enhanced fat pads and body weight (Fig. 1), adipocytes were of larger size in response to the HFHS diet. However, there was no major difference in the mean diameter of adipocytes of both fat pads in response to exposure to the mixture of pollutants (Supplementary Fig. 3).

3.5. Gene expression analysis of inflammatory markers in adipocyte tissues

It is well described that AT inflammation conveys insulin-resistance (Ouchi et al., 2011). Pollutants have also been described as pro-inflammatory in certain conditions (Rebourcet et al., 2010; Kim et al., 2012; Magre et al., 2012; La Merrill et al., 2013). We therefore examined the expression levels of genes including *Tnfα*, *Il-1b* and *Ccl2* encoding major pro-inflammatory

markers TNFα, interleukin 1 (IL1) β, and MCP1, respectively, as well as *Il10* encoding an anti-inflammatory cytokine, interleukin 10. Apart from *Il10* which expression levels did not change in response to HFHS diet alone (Figs. 4C and 5C), most pro-inflammatory cytokines had their expression significantly enhanced in both AT samples from HFHS-fed mice consistent with the phenotype of insulin resistance evidenced in this HF0 group as compared to ST0 group. *Il-1β* expression was the exception with a down-regulation of its mRNA levels in pgAT samples of HFHS-fed mice (Fig. 5C).

Interestingly, as well as for adipogenesis and lipolysis markers, pollutants had differential impact depending on AT depots. In a standard diet context, the global impact was anti-inflammatory in scAT samples with significant enhancement of *Il10* mRNA expression (Fig. 4C) and no impact on pro-inflammatory cytokines (Fig. 4C). In HFHS-fed mice, the inflammatory state based on the investigated studies remained unchanged by pollutant exposure in scAT (Fig. 5C). Conversely, pollutants tended to reduce the pro-inflammatory state in pgAT, although *Il10* expression remained unchanged, with a significant and strong down-regulation of *Il1b* mRNA levels in response to pollutant exposure in ST-fed mice. Contrary to the observed decrease in *Il1b* expression after exposure to HFHS diet in the absence of pollutant, the exposure to the mixture in this HFHS context induced an increased expression of this gene (Fig. 5C).

3.6. Gene expression analysis of xenobiotic receptors

One way pollutants trigger metabolic disruption is through their direct interaction with xenobiotic receptors and downstream activation of xenobiotic processing genes, among which cytochromes P450 (CYPs) (Aleksunes and Klaassen, 2012). Therefore, a gene expression analysis of the xenobiotic receptors was undertaken. The expression of Ahr encoding the dioxin receptor AHR, could be detected in all investigated tissues consistent with its ubiquitous expression (Barouki et al., 2012a). A HFHS effect on *Ahr* expression was observed in jejunum, liver and scAT but not in pgAT with a significant down-regulation of the Ahr mRNA levels (Fig. 6A). The AHR target gene *Cyp1a2* was also reduced at the mRNA levels in liver (Fig. 6A) but could not be quantifiable in the jejunum and adipose tissues (not shown). Expression of *Nr1i2* encoding Pregnane X Receptor (PXR) and *Nr1i3* encoding Constitutive Androstane Receptor (CAR) was detected in jejunum and liver (Fig. 6B–C) but not in ATs (not shown). Neither *Nr1i2* nor *Nr1i3* had their expression levels modified by nutritional stressors in liver. In contrast, the expression of *Nr1i2* was significantly decreased in the jejunum samples from HFHS-fed mice while *Nr1i3* expression tended to increase ($P = 0.06$) as compared to ST0-fed mice (Fig. 6C).

Interestingly, a trend ($P = 0.06$) for enhanced expression of *Nr1i3* was also detected in the jejunum of STp as compared to ST0 mice, which is consistent with the significant augmentation of the

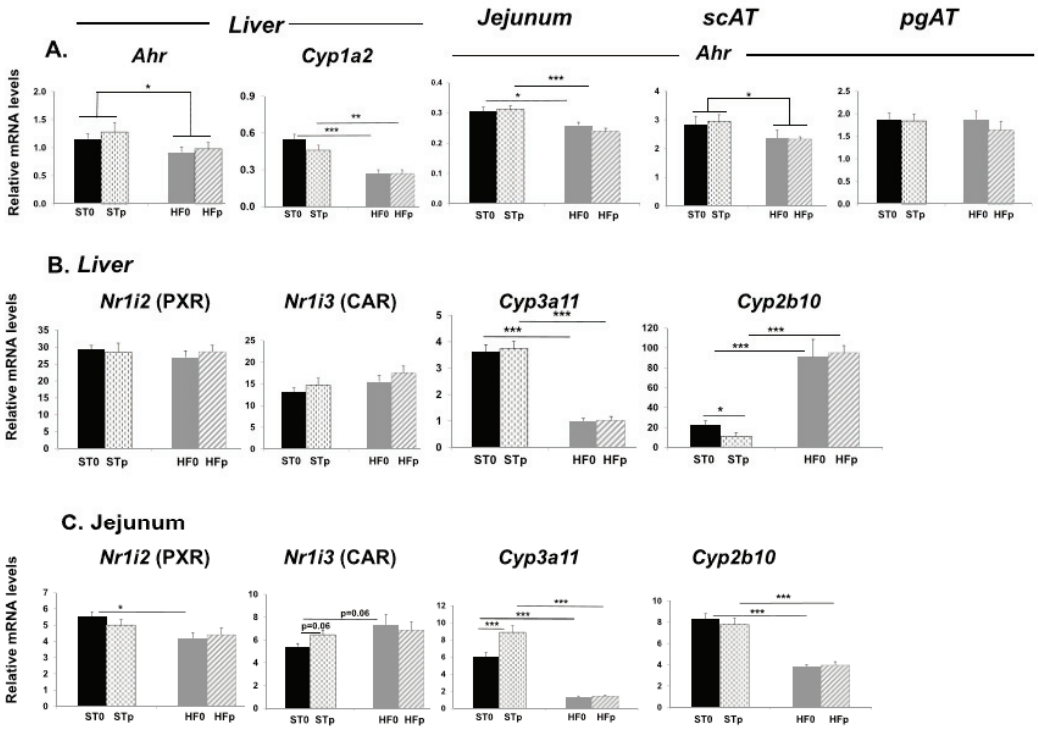


Fig. 6. Effect of the HFHS diet and the mixture of pollutants on the expression of genes encoding xenobiotic receptors. Ahr and Cyp1a2 mRNA expression in liver; Ahr mRNA expression in jejunum, scAT and pgAT **(A)**. Nr1i2 and Nr1i3 mRNA expression and their respective target gene en liver **(B)** and jejunum **(C)**. Values are means ± SEM with n = 8. ***P < 0.001; *P < 0.05.

expression of *Cyp3a11*, a PXR target gene (Fu et al., 2016). In contrast, the HFHS diet induced a significant and robust decrease of the expression levels of *Cyp3a11* in jejunum and liver (Fig. 6B–C). Results in liver are consistent with previous reports (Fromenty, 2013) although discrepancies still exist regarding the regulation of *Cyp3a11* expression in the liver of high-fat fed mice (Ning and Jeong, 2017). Intriguingly, expression levels of *Cyp2b10*, a CAR target gene (Aleksunes and Klaassen, 2012), was significantly down-regulated in jejunum and up-regulated in liver from HFHS-fed mice. Noteworthy, a significant down-regulation of the expression of *Cyp2b10* was observed in STp versus ST0 liver samples (Fig. 6B–C). No alteration of the expression of *Ugt1a1*, also a CAR target gene, was noted between groups in jejunum and liver (data not shown).

3.7. Gene expression analysis of estrogen and androgen receptors

To complete the study, we surveyed receptors for estrogen and androgen because steroid hormones regulate energy metabolism (Mauvais-Jarvis, 2011) and that the pollutants of the mixture have been endowed with estrogeno-mimetic activities by interacting either with steroid signaling or its signaling machinery (Casals-Casas and Desvergne, 2011; Thayer et al., 2012). ERα, encoded by the gene *Esr1*, is the main receptor in rodent liver (Gao et al., 2008). The liver is also expressing the Androgen Receptor (AR, encoded by *Nr3c4*) (Lin et al., 2008). While the expression of *Esr1* and *Nr3c4* was detected in the liver, these genes were not found expressed in the jejunum (data not shown) contrary to *Gper1* encoding the G Protein-Coupled Estrogen Receptor 30 (GPR30), a membrane estrogen receptor (Sharma et al., 2018). These 3 genes were expressed in both scAT and pgAT (Fig. 7C and D). In response to the HFHS diet, expression levels of *Nr3c4* were significantly reduced in ATs but augmented in liver. *Esr1* expression levels were also altered by the HFHS diet in liver and ATs, but only under pollutant exposure, with a significant increase in liver (Fig. 7A) and a significant decrease in ATs (Fig. 7C and D). Strongest effects were observed on *Gper1* mRNA levels in ATs with 2.2 and 1.6-fold increases in scAT and pgAT, respectively, while there was a significant decrease of 20% in jejunum (Fig. 7B–D). Pollutant exposure in a standard diet context resulted in a 1.5-fold increase of *Esr1* mRNA levels ($P < 0.01$) in scAT but not in pgAT or liver (Fig. 7). In jejunum, pollutants also induced a downward trend ($P = 0.07$) in *Gper1* expression, only in HFHS-fed mice (Fig. 7B). Importantly, the ratio *Esr1/Nr3c4* was significantly up-regulated by pollutant exposure in the scAT of ST-fed mice but remained unchanged in pgAT samples. A significant increase was induced by the HFHS diet in scAT (Fig. 7C). In the liver, this ratio was significantly reduced in response to the HFHS diet (HF0 *vs* ST0) and a tendency to decrease ($P = 0.05$) was observed under pollutant exposure in a standard diet context (Fig. 7A).

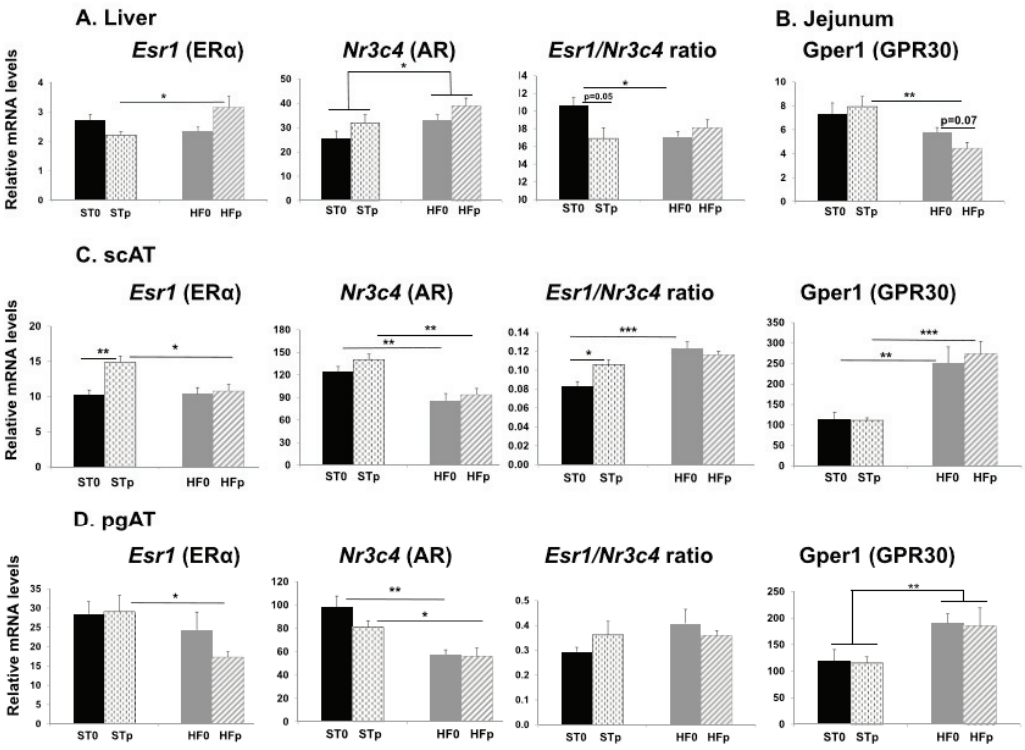


Fig. 7. Effect of the HFHS diet and the mixture of pollutants on the expression of genes encoding estrogen and androgen receptors in liver **(A)**, jejunum **(B)**, scAT **(C)** and pg AT **(D)**. Values are means ± SEM with n = 8. ***P < 0.001; **P < 0.01; *P < 0.05.

4. Discussion

The results of the present study indicate that exposure to a mixture of low-dose pollutants for 15 weeks triggers metabolic effects in male mice challenged from 5 wks onwards in the absence of general toxicity and that the resulting effects depended on the nutritional status, i.e., ST or HFHS diet, thus extending previous data of the laboratory (Naville et al., 2013, 2015; Labaronne et al., 2017). In addition, this study indicates, in an original way, that low-dosed pollutant cocktail exposure elicited tissue-specific responses at least at the gene expression mRNA level. Specifically, we herein demonstrated that jejunum and adipose tissues were major targets of xenobiotics in this one-generation experimental study and that scAT responded differently to the pollutant mixture than pgAT.

The protocol used herein was adapted from the previously described model (Naville et al., 2013, 2015; Labaronne et al., 2017) in that mice were either fed a standard or a HFHS diet containing the mixture of pollutants with treatments starting from the age of 5 weeks for a total duration of 15 weeks. As reviewed (Le Magueresse-Battistoni et al., 2017), pollutants comprising the used mixture were selected to approach a realistic scenario with both persistent and non-persistent chemicals, all bearing endocrine-disrupting activities and all of high concern for human health for their suspected links with metabolic diseases (Alonso-Magdalena et al., 2011; Casals-Casas and Desvergne, 2011; Gore et al., 2015). Thus, this one-generation study allowed investigating in males (females were not explored in this report) the metabolic impact of the pollutant mixture in a standard and in a HFHS diet context to better understand the individual and combined contribution of both threats to the nowadays epidemics of metabolic diseases. In addition to a thorough metabolic exploration of male mice fed the high-fat high-sucrose diet, we investigated the regulation of target gene expression in the liver, adipose tissues, and the jejunum. Both liver and jejunum play major detoxifying role and express the repertoire of xenobiotic processing genes including xenobiotic receptors and related transcription factors as well as phase I and II metabolizing enzymes and transporters (Fu et al., 2016). In addition, the small intestine is the first organ directly in contact with the dietary nutrients and the contaminating chemicals.

Within this study, HFHS diet recapitulated metabolic disorders linked to obesity and insulin resistance including dyslipidemia, hyperglycemia, elevated plasma levels of insulin and leptin. Interestingly, the metabolic impact was found more deleterious herein than in the two-generation study with regards to insulin resistance (Homa-IR) and leptin levels (Naville et al., 2013). There was also impaired lipid homeostasis as evidenced through the oral lipid load test and the findings of enhanced expression of several genes encoding proteins involved in lipid transport and/or lipoprotein synthesis in the jejunum, in fat uptake and lipogenesis favoring steatosis in the liver. In addition, fat mass was largely increased with an overall inflammatory profile in both ATs (apart from a decreased *Il1b* expression in pgAT) and augmented adipogenesis in scAT. Curiously, jejunum has so far not been extensively investigated in response to HFHS diet and several features, indicative of alterations in jejunum homeostasis, could be originally described in the present study. The anti-inflammatory cytokine *Il10* gene expression was severely down-regulated concurrently with the decreased expression of genes encoding the estrogen receptor *Gper*, the xenobiotic receptors *Ahr* and *Nr1i2* as well as processing genes *Cyp3a11* and *Cyp2b10*. Additional work would help to resolve why *Nr1i2* and *Nr1i3* mRNA levels did not change the same way in liver and jejunum in response to HFHS diet along with their target genes, *Cyp3a11* and *Cyp2b10*. Namely, CYP3A11 is an important phase I enzyme which catalyzes detoxification of a wide range of substrates thus, in the long run, an inhibition of this enzyme, as observed in both jejunum and liver, would be harmful consistent with reduced metabolization of pharmacological drugs in obese patients (Fromenty, 2013). Whether increased *Cyp2b10* mRNA levels will compensate for the decreased *Cyp3a11* expression in liver warrants further study.

Interestingly, mice fed the HFHS diet in this experimental study retained some metabolic adaptability as exemplified with the mild hepatic phenotype (accumulation of TG with limited inflammation) and unchanged FFA levels restricting lipotoxicity. The upregulation of genes encoding inhibitors of lipoprotein activity in liver and jejunum and the down-regulation of a LPL activator in liver may have also contributed to this phenotype. In addition, gene expression studies suggested restrained hypercholesterolemia through a reduced expression of *Npc1l1* which encoding protein transports cholesterol in jejunum and of genes encoding protein involved in liver cholesterol synthesis (*Hmgcr, Cyp51*) coupled to its enhanced metabolization (*Cyp7a1*) in biliary acids. Importantly, AT depots responded differently to the HFHS diet with regards to inflammation, adipocyte differentiation, *Ahr* expression as well as estrogen and androgen receptors. Because it is known that estrogens favor subcutaneous over visceral fat (Mauvais-Jarvis, 2011), it would be of interest to determine if the relative limitation of the metabolic disorders observed in male mice fed the HFHS diet, particularly concerning the fasting plasma glucose, could not be linked to the enhanced ratio of *Esr1/Nr3c4* found in the scAT.

Analysis of the metabolic impact of a chronic exposure to the mixture of pollutants revealed that effects were more marked in ST than in HFHS-fed mice. A major difference with the HFHS threat consisted in the lack of any effect of pollutants on body weight which is consistent with our previous data using the same mixture of pollutants (Naville et al., 2013, 2015; Labaronne et al., 2017). In addition and contrasting with previous published data using the chemicals present in the mixture but tested individually and at higher doses (Wahlang et al., 2013; Wei et al., 2014; Duval et al., 2017; Heindel et al., 2017), the pollutant cocktail did not trigger hepatic TG accumulation nor was the HFHS-induced TG accumulation exacerbated in the pollutant-exposed mice. Discrepancies may be due to a different diet composition, differences in the experimental chemical doses, the strain species and the period of exposure to the pollutants which excluded in the present study the highly vulnerable maternal period (Barouki et al., 2012b). However, one remarkable effect was the alteration of the post-prandial plasma TG (in response to an oral lipid load) in ST-fed pollutant-exposed males while glucose absorption was not affected. Post-prandial TG levels result from intestinal TG secretion and clearance which depend on expression levels of several binding proteins and apolipoproteins (Drover et al., 2005; Petit et al., 2007). Interestingly, the significant increase of blood TG clearance in STp vs ST0 mice is consistent with the decrease in the 6h-fasting plasma TG. In addition, the concomitant decrease in *Apoc3* gene expression in the jejunum might suggest a higher efficiency of TG clearance by LPL (Petit et al., 2007). The reduced plasma TG levels associated with the trend to decreased FFA levels induced by the pollutants in a ST context were also indicative of changes in lipid metabolism.

Regarding gene expression analysis of xenobiotic receptors, a trend for an elevation of *Nr1i3* expression and a significant enhancement in *Cyp3a11* mRNA levels were shown in jejunum of STp vs ST0 mice, but not in liver, again documenting that jejunum is highly responsive to its environment. The meaning of the significant decrease of *Cyp2b10* expression in liver, an enzyme which regulation is dependent on estrogens (Yamada et al., 2002) could be linked to estrogen signaling impairment in response to pollutant exposure. Moreover, metabolic tissues express estrogen and/or androgen receptors and there was a significant increase of the ratio

of *Esr1* to *Nr3c4 mRNA* levels in scAT from STp *vs* ST0 mice, and a trend to a decrease of this same ratio in liver, all indicative of changes in the estrogen signaling in these tissues. Additionally, it is possible that the enhanced ratio of adiponectin to leptin that we observed in the STp male mice and which suggests a better insulin sensitivity was linked to the estrogen signaling changes in adipose tissues as adiponectin and leptin are synthesized by these tissues.

There were other features in addition to the effect of pollutants on plasma TG and on the ratio of adiponectin to leptin which were the opposite of the effect induced by the HFHS diet, such as the findings of reduced levels of *Il-1β* mRNA levels in pgAT, *Apoc3* in jejunum, *Cyp2b10* in liver as well as enhanced *Il10* expression in scAT and of *Cyp3a11* in jejunum, all from STp *vs* ST0 mice. However, not all of the pollutant effects were opposite to those observed in response to the HFHS diet. Interestingly, we observed effects mimicking HFHS-induced metabolic disorders in the scAT. For example, there were enhanced expressions of genes encoding markers of lipolysis and adipogenesis suggesting higher differentiation of subcutaneous adipocytes. Collectively, and in line with a recently proposed hypothesis of an estrogeno-mimetic effect of the pollutant mixture (Julien et al., 2018), our data could suggest that the pollutant-induced changes of estrogen signaling may favor subcutaneous over visceral fat as described in males fed the HFHS diet (this study) or injected with estradiol E2 (Clegg et al., 2006), resulting in the "feminization" of the fat deposition. Whether, such "feminization" will explain all of the changes described in STp fed mice will warrant further studies.

Another finding of the present study is that, according to the diet, the effects of the pollutants were either to alleviate or to aggravate metabolic features. Indeed, exposure of HFHS-fed mice to the pollutant mixture could aggravate some of the effects of the HFHS alone such as the increased weight of the pgAT depot and the slight but not significant enhancement of plasma leptin levels. There were also significant spotted impacts on gene expression in jejunum and pgAT. Specifically, the increased (*Mttp*) or decreased (*Gper1* and *Slc27a4*) expressions in jejunum were only observed in HFHS-fed pollutant exposed mice not in absence of pollutant. As well, pollutants induced a strong significant increase of Il10 expression in jejunum in the HFHS context (the reverse effect being observed in ST-fed pollutant exposed mice). In this HFHS context, pollutants were capable to decrease *Nr1c3* and increase *Il1b* expression in pgAT only, thus amplifying the impact of the HFHS diet.

These data obtained from post-weaning studies induced metabolic changes somehow different from the previous two-generation study in which male adult offspring showed reduced hepatic cholesterol levels and alteration of cholesterol metabolism in response to the HFHS diet-containing pollutants. If comparing the one- (this study) and two-generation (Naville et al., 2013) studies on the various endpoints monitored, cholesterol metabolism does not appear to be a major pollutant target in the present study apart from *Cyp7a1* enhancement. Discrepancies do not seem to rely to the difference in pollutant dosage between the two experimental protocols. Because we previously demonstrated that the low-dose pollutant mixture could trigger metabolic disturbances leading to common and specific features as compared to a HFHS diet (Labaronne et al., 2017), it may be considered that some effects of the pollutants could be masked by the more pronounced effect of the HFHS diet in this study regarding body weight and markers of insulin resistance (HOMA-IR, leptin levels) than in the two-generation study (Naville et al., 2013). Thus, a more likely explanation for differences in metabolic outcome in HFHS-fed pollutant exposed mice could be in line with the Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD) concept (Barker et al., 2002; Suzuki, 2018). This concept proposes that part of adult diseases finds their origins during fetal life which is a highly vulnerable period of time specifically with regards to pollutant exposure (Barker et al., 2002; Barouki et al., 2012b; Le Magueresse-Battistoni et al., 2016).

In conclusion, the present study underlines that the threat posed by a Western-style diet relates to the fat and sugar content but that pollutants which contaminate food are also part of the equation. In addition to evidences for metabolic deleterious effects of the HFHS diet in line with obesity associated metabolic features and insulin resistance, we demonstrated, at least at the mRNA expression level that metabolic tissues responded in a tissue-specific way to the cocktail of pollutants and that the greatest metabolic impact of pollutants was evidenced in standard nutritional conditions in this one-generation study. Importantly, jejunum was highly sensitive with regards to xenobiotic receptors and lipolysis and AT depots responded differently to both nutritional stressors. Moreover, the impact of pollutants was found to mimic or oppose the HFHS effects in a manner depending on nutritional conditions and on the metabolic tissue considered. Collectively and although pollutants in the mixture have not been tested individually, we here reinforce previous observations (Le Magueresse-Battistoni et al., 2017) that the resulting effect of a mixture of low dosed pollutants cannot be derived from the expected effect of one chemical at a time based on its dosage and this is raising important implications in terms of recommendations for food market security.

Acknowledgments

This work was supported by INSERM and University of Lyon1 to INSERM U1060. Benoit Julien is supported by a research fellowship from the French "Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche". The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. We gratefully acknowledge Emmanuelle Loizon and Sandra Pesenti for the technical help with PCR primers and Patrick Manas for animal care.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.177.

References

Aleksunes, L.M., Klaassen, C.D., 2012. Coordinated regulation of hepatic phase I and II drug-metabolizing genes and transporters using AhR-, CAR-, PXR-, PPAR-alpha-, and Nrf2-null mice. Drug Metab. Dispos.: Biol. Fate. Chem. 40, 1366–1379.
Alonso-Magdalena, P., Quesada, I., Nadal, A., 2011. Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. Nat. Rev. Endocrinol. 7, 346–353.
Angrish, M.M., Mets, B.D., Jones, A.D., et al., 2012. Dietary fat is a lipid source in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-rho-dioxin (TCDD)-elicited hepatic steatosis in C57Bl/6 mice. Toxicol. Sci.: Off. J. Soc. Toxicol. 128, 377–386.
Barker, D.J., Eriksson, J.G., Forsen, T., et al., 2002. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. Int. J. Epidemiol. 31, 1235–1239.
Barouki, R., Aggerbeck, M., Aggerbeck, L., et al., 2012a. The aryl hydrocarbon receptor system. Drug Metab. Drug Interact. 27, 3–8.
Barouki, R., Gluckman, P.D., Grandjean, P., et al., 2012b. Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. Environ. Health 11, 42.
Beausoleil, C., Emond, C., Cravedi, J.P., et al., 2018. Regulatory identification of BPA as an endocrine disruptor: context and methodology. Mol. Cell. Endocrinol. 475, 4–9.
Casals-Casas, C., Desvergne, B., 2011. Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. Annu. Rev. Physiol. 73, 135–162.
Chen, Z., YU, R., Xiong, Y., et al., 2017. A vicious circle between insulin resistance and inflammation in nonalcoholic fatty liver disease. Lipids Health Dis. 16, 203.
Clegg, D.J., Brown, L.M., Woods, S.C., et al., 2006. Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. Diabetes 55, 978–987.
Conarello, S.L., JIANG, G., MU, J., et al., 2007. Glucagon receptor knockout mice are

resistant to diet-induced obesity and streptozotocin-mediated beta cell loss and hyperglycaemia. Diabetologia 50, 142–150.
Diamanti-kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., et al., 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. Endocr. Rev. 30, 293–342.
Dorne, J.L., 2010. Metabolism, variability and risk assessment. Toxicology 268, 156–164.
Drover, V.A., Ajmal, M., Nassir, F., et al., 2005. CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood. J. Clin. Invest. 115, 1290–1297.
Duval, C., Teixeira-Clerc, F., Leblanc, A.F., et al., 2017. Chronic exposure to low doses of dioxin promotes liver fibrosis development in the C57BL/6J diet-induced obesity mouse model. Environ. Health Perspect. 125, 428–436.
F., Processing aids and materials in contact with food European food safety authority panel on food additives, 2005. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) for use in food contact materials. Question N° EFSA-Q-2003-191. EFSA J. 243, 1–20.
Fromenty, B., 2013. Drug-induced liver injury in obesity. J. Hepatol. 58, 824–826.
Fu, Z.D., Selwyn, F.P., Cui, J.Y., et al., 2016. RNA sequencing quantification of xenobiotic-processing genes in various sections of the intestine in comparison to the liver of male mice. Drug Metab. Dispos.: Biol. Fate. Chem. 44, 842–856.
Gao, H., Falt, S., Sandelin, A., et al., 2008. Genome-wide identification of estrogen receptor alpha-binding sites in mouse liver. Mol. Endocrinol. (Baltimore, Md 22, 10–22.
Gore, A.C., Chappell, V.A., Fenton, S.E., et al., 2015. EDC-2: the endocrine society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. Endocr. Rev. 36, E1–E150.
Gout, J., Sarafian, D., Mutel, E., et al., 2010. Metabolic and melanocortin gene expression alterations in male offspring of obese mice. Mol. Cell. Endocrinol. 319, 99–108.
Greco, D., Kotronen, A., Westerbacka, J., et al., 2008. Gene expression in human NAFLD. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 294, G1281–G1287.
Heindel, J.J., Blumberg, B., Cave, M., et al., 2017. Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. Reprod. Toxicol. 68, 3–33.
Julien, B., Pinteur, C., Vega, N., et al., 2018. Evidence for estrogeno-mimetic effects of a mixture of low-dose pollutants in a model of ovariectomized mice. Environ. Toxicol. Pharmacol. 57, 34–40.
Kim, M.J., Pelloux, V., Guyot, E., et al., 2012. Inflammatory pathway genes belong to major targets of persistent organic pollutants in adipose cells. Environ. Health Perspect. 120, 508–514.
Koch, H.M., Calafat, A.M., 2009. Human body burdens of chemicals used in plastic manufacture. Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B Biol. Sci. 364, 2063–2078.
Kortenkamp, A., 2014. Low dose mixture effects of endocrine disrupters and their implications for regulatory thresholds in chemical risk assessment. Curr. Opin. Pharmacol. 19, 105–111.
La Merrill, M., Emond, C., KIM, M.J., et al., 2013. Toxicological function of adipose tissue: focus on persistent organic pollutants. Environ. Health Perspect. 121, 162–169.
Labaronne, E., Pinteur, C., Vega, N., et al., 2017. Low-dose pollutant mixture triggers metabolic disturbances in female mice leading to common and specific features as compared to a high-fat diet. J. Nutr. Biochem. 45, 83–93.
Le Magueresse-Battistoni, B., Vidal, H., Naville, D., 2016. Impact of in utero exposure to pollutants on metabolic health in adults. Med. Sci. 32, 51–56. M/S.
Le Magueresse-Battistoni, B., Labaronne, E., Vidal, H., et al., 2017. Endocrine disrupting chemicals in mixture and obesity, diabetes and related metabolic disorders. World J. Biol. Chem. 8, 108–119.
Le Magueresse-Battistoni, B., Vidal, H., Naville, D., 2018a. Environmental pollutants and metabolic disorders: the multi-exposure scenario of life. Front. Endocrinol. 9, 582.
Le Magueresse-Battistoni, B., Multigner, L., Beausoleil, C., et al., 2018b. Effects of bisphenol A on metabolism and evidences of a mode of action mediated through endocrine disruption. Mol. Cell. Endocrinol. 475, 74–91.
Le Magueresse-Battistoni, B., Vidal, H., Naville, D., 2018c. Sex-specific metabolic alterations induced by environmental pollutants. Current Opin. Toxicol. 8, 1–7. http://www.hal.inserm.fr/inserm-01743795.
Lin, H.Y., Yu, I.C., Wang, R.S., et al., 2008. Increased hepatic steatosis and insulin resistance in mice lacking hepatic androgen receptor. Hepatology (Baltimore, Md.) 47, 1924–1935.
Lopez-Jaramillo, P., Gomez-Arbelaez, D., Lopez-Lopez, J., et al., 2014. The role of leptin/adiponectin ratio in metabolic syndrome and diabetes. Horm. Mol. Biol. Clin. Invest. 18, 37–45.
Magre, S., Rebourcet, D., ISHAQ, M., et al., 2012. Gender differences in transcriptional signature of developing rat testes and ovaries following embryonic exposure to 2,3,7,8-TCDD. PLoS One 7, e40306.
Mauvais-Jarvis, F., 2011. Estrogen and androgen receptors: regulators of fuel homeostasis and emerging targets for diabetes and obesity. Trends Endocrinol. Metabol.: TEM 22, 24–33.
Mirza, S., Qu, H.Q., Li, Q., et al., 2011. Adiponectin/leptin ratio and metabolic syndrome in a Mexican American population. Clinical and investigative medicine. Méd. Clin. Exp. 34, E290.
Muncke, J., 2009. Exposure to endocrine disrupting compounds via the food chain: is packaging a relevant source? Sci. Total Environ. 407, 4549–4559.
Naville, D., Rebourcet, D., Chauvin, M.A., et al., 2011. Direct and indirect impact of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on adult mouse Leydig cells: an in vitro study. Toxicol. Lett. 207, 251–257.
Naville, D., Pinteur, C., Vega, N., et al., 2013. Low-dose food contaminants trigger sex-specific, hepatic metabolic changes in the progeny of obese mice. FASEB J.: Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exper. Biol. 27, 3860–3870.
Naville, D., Labaronne, E., Vega, N., et al., 2015. Metabolic outcome of female mice exposed to a mixture of low-dose pollutants in a diet-induced obesity model. PLoS One 10, e0124015.
Ning, M., Jeong, H., 2017. High-fat diet feeding alters expression of hepatic drug-metabolizing enzymes in mice. Drug Metab. Dispos.: Biol. Fate. Chem. 45, 707–711.
Ouchi, N., Parker, J.L., Lugus, J.J., et al., 2011. Adipokines in inflammation and metabolic disease. Nat. Rev. Immunol. 11, 85–97.
Pavek, P., 2016. Pregnane X receptor (PXR)-Mediated gene repression and cross-talk of PXR with other nuclear receptors via coactivator interactions. Front. Pharmacol. 7, 456.
Petit, V., Arnould, L., Martin, P., et al., 2007. Chronic high-fat diet affects intestinal fat absorption and postprandial triglyceride levels in the mouse. J. Lipid Res. 48, 278–287.
Rebourcet, D., Odet, F., Verot, A., et al., 2010. The effects of an in utero exposure to 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin on male reproductive function: identification of Ccl5 as a potential marker. Int. J. Androl. 33, 413–424.
Roder, P.V., Geillinger, K.E., Zietek, T.S., et al., 2014. The role of SGLT1 and GLUT2 in intestinal glucose transport and sensing. PLoS One 9, e89977.
Schafer, K.S., Kegley, S.E., 2002. Persistent toxic chemicals in the US food supply. J. Epidemiol. Community Health 56, 813–817.
Schug, T.T., Janesick, A., Blumberg, B., et al., 2011. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 127, 204–215.
Sharma, G., Mauvais-Jarvis, F., Prossnitz, E.R., 2018. Roles of G protein-coupled estrogen receptor GPER in metabolic regulation. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 176, 31–37.
Startin, J.R., Sharman, M., Rose, M.D., et al., 1987. Migration from plasticized films into foods. 1. Migration of di-(2-ethylhexyl)adipate from PVC films during home-use and microwave cooking. Food Addit. Contam. 4, 385–398.
Suzuki, K., 2018. The developing world of DOHaD. J. Dev. Origin. Health Disease 9, 266–269.
Svingen, T., Vinggaard, A.M., 2016. The risk of chemical cocktail effects and how to deal with the issue. J. Epidemiol. Community Health 70, 322–323.
Thayer, K.A., Heindel, J.J., Bucher, J.R., et al., 2012. Role of environmental chemicals in diabetes and obesity: a National Toxicology Program workshop review. Environ. Health Perspect. 120, 779–789.
Tilg, H., Moschen, A.R., 2008. Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. Trends Endocrinol. Metabol.: TEM 19, 371–379.
Van Leeuwen, F.X., Feeley, M., Schrenk, D., et al., 2000. Dioxins: WHO's tolerable daily intake (TDI) revisited. Chemosphere 40, 1095–1101.
Vandenberg, L.N., Hauser, R., Marcus, M., et al., 2007. Human exposure to bisphenol A (BPA). Reprod. Toxicol. 24, 139–177.
Vandenberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., et al., 2012. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. Endocr. Rev. 33, 378–455.
Vom Saal, F.S., Nagel, S.C., Coe, B.L., et al., 2012. The estrogenic endocrine disrupting chemical bisphenol A (BPA) and obesity. Mol. Cell. Endocrinol. 354, 74–84.
Wahlang, B., Falkner, K.C., Gregory, B., et al., 2013. Polychlorinated biphenyl 153 is a diet-dependent obesogen that worsens nonalcoholic fatty liver disease in male C57BL6/J mice. J. Nutr. Biochem. 24, 1587–1595.
Wei, J., Sun, X., Chen, Y., et al., 2014. Perinatal exposure to bisphenol A exacerbates nonalcoholic steatohepatitis-like phenotype in male rat offspring fed on a high-fat diet. J. Endocrinol. 222, 313–325.
WHO, 2003. Polychlorinated Biphenyls: Human Health Aspects. Concise International Chemical Assessement Document, vol. 55. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
WHO, 2016. Obesity and Diabetes: the Slow-motion Disaster Keynote Address at the 47th Meeting of the National Academy of Medicine. Chan M. http://www.who.int/dg/speeches/2016/obesity-diabetes-disaster/en/.
WHO, 2017. Diabetes. http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes.
WHO. 2018a. Obesity and Overweight. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/.
WHO, 2018b. The Top 10 Causes of Death. http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death.
WHO/UNEP, 2013. prepared by a group of experts for the. In: Bergman, Åke, Heindel, Jerrold J., Jobling, Susan, Kidd, Karen A., Thomas Zoeller, R. (Eds.), State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals - 2012. An Assessment of the State of the Science of Endocrine Disruptors. United Nations Environment Programme (UNEP) and WHO. http://www.who.int/ceh/publications/endocrine/en/.
Yamada, H., Gohyama, N., Honda, S., et al., 2002. Estrogen-dependent regulation of the expression of hepatic Cyp2b and 3a isoforms: assessment using aromatase-deficient mice. Toxicol. Appl. Pharmacol. 180, 1–10.
Zoeller, R.T., Bergman, A., Becher, G., et al., 2014. A path forward in the debate over health impacts of endocrine disrupting chemicals. Environ. Health 13, 118.

Supplementary Tables

Supplementary Table 1: References doses of the pollutants present in the mixture and doses used in the diets (all per kg and per day).

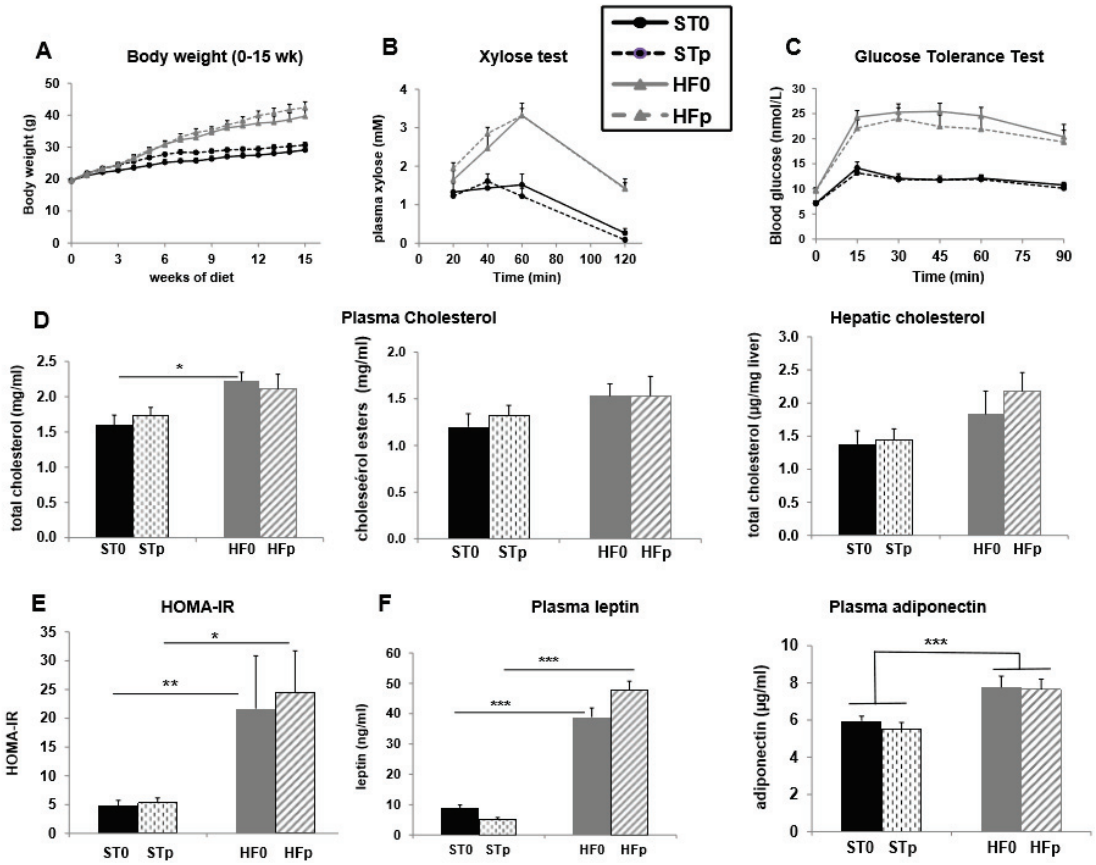
Pollutants in the mixture	PCB153	BPA	TCDD	DEHP
NOAEL	40µg	5mg	2 ng	5mg
TDI	20ng	4µg	1-4pg	50µg
doses used	200ng	40µg	20pg	500µg

Supplementary Table 2: List of the primers used in RT-qPCR

		sequences: 5'->3'	
gene	reference	sense	antisense
Abca1	NM_013454	CAG-GAG-GTG-ATG-TTT-CTG-ACC-A	TTG-GCT-GTT-CTC-CAT-GAA-GGT-C
Abcg5	NM_031884	AGC-CTC-GCT-CTG-AGC-TCT-TC	TTC-AGG-ACA-GGG-GTA-ACC-AC
Abcg8	NM_026180;NM_001286005	AGC-CTC-GCT-CTG-ACA-TCT-TC	GTC-AAG-TCC-ACG-TAG-AAG-TC
Acaca	NM_022193	GAG-CAA-GGG-ATA-AGT-TTG-AG	AGG-TGC-ATC-TTG-TGA-TTA-GC
Ahr	NM_013464.4	TCA-TCT-GGT-TTC-CTG-GCA-ATG-AAT	ATA-AGC-TGC-CCT-TTG-GCA-TC
Angptl4	NM_020581	GA-CCT-TAA-CTG-TGC-CAA-GAG	AAG-TCA-CTG-TCT-TCT-TAG-GC
Apoa5	NM_080434	AGA-GCC-TCT-GGG-ACT-ACT-TC	GTC-CCA-GCT-TTT-CTA-GGT-AA
Apoc3	NM_001289755;NM_001289756;NM_023114;NM_001289833	GCT-AAG-TAG-CGT-GCA-GGA-GT	TCC-TCA-GGG-TTA-GAA-TCC-CA
Ccl2	NM_011333	TGG-AGC-ATC-CAC-GTG-TTG-GC	ACT-ACA-GCT-TCT-TTG-GGA-CA
Cd36	NM_001159558.1	AAG-ATC-CAA-AAC-TGT-CTG-TA	GTC-CTG-GCT-GTG-TTT-GGA-GG
Cidec	NM_178373;NM_001301295	TGG-CAC-AAT-CGT-GGA-GAC-AG	AGA-GGG-TTG-CCT-TCA-CGT-TC
Cpt1a	NM_001876;NM_001031847	TAC-AAC-AGG-TGG-TTT-GAC-A	GGC-TGT-CAA-TGG-ACA-TGA-CG
Cyp1a2	NM_009993	TCA-TCC-TGG-AGA-TCT-ACC-GA	TGA-CCT-GCC-ACT-GGT-TTA-TG
Cyp51	NM_020010	AGT-GCC-TGG-ATG-GGC-TTC-TT	GGA-GGC-CTC-AGT-CTT-AGT-GT
Cyp3a11	NM_007818	ACG-CCT-CTC-CTT-GCT-GTC-ACC	TTG-CCT-TCT-GCC-TCA-AGT-AC
Cyp7a1	NM_007824.2	TAC-AGA-GTG-CTG-GCC-AAG-AG	AGT-GAA-GTC-CTC-CTT-AGC-TG
Cyp2b10	NM_009999	TTC-TGC-CCT-TCT-CAA-CAG-GA	CCT-TAG-GAG-CAA-CAT-GGC-TT
Esr1	NM_000125;NM_001122740;NM_001122741;NM_001122742	TGT-TTG-CTC-CTA-ACT-TGC-TC	CCT-TCT-CTT-CCA-GAG-ACT-TC
Fabp1	NM_017399	TGC-GAA-CTG-GAG-ACC-ATG-AC	CCA-ATG-TCA-TGG-TAT-TGG-TG
Fabp4	NM_024406	CAG-AAG-TGG-GAT-GGA-AAG-TCG	CGA-CTG-ACT-ATT-GTA-GTG-TTT-GA
Got2	NM_010325	ATG-GTG-AAG-GAT-GCC-TGG	TTC-ATC-CGC-ATC-TTT-GCA-GAC-C
Gper1	NM_029771	AGC-TGA-TCA-GAT-CTA-GGG-AG	GTC-CTG-GGA-GCC-TGT-TAG-TC
Gusb	NM_010368	CTT-CAT-GAC-GAA-CCA-GTC-AC	GCA-ATC-CTC-CAG-TAT-CTC-TC
Hmgcr	NM_008255	CCG-GCC-TGT-GTG-TCG-CTG-GT	CCA-GCG-ACT-ATG-AGC-GTG-AA
Hprt	NM_013556	TTG-CTG-ACC-TGC-TGG-ATT-AC	AGT-TGAG-AGA-TCA-TCT-CCA-C
Il1b	NM_008361	ACT-GTT-CCT-GAA-CTC-AAC-TG	CTT-GTT-GAT-GTG-CTG-CTG-CG
Il6	NM_031168	AGT-TGC-CTT-CTT-GGG-ACT-GAT	TCC-ACG-ATT-TCC-CAG-AGA-AC
Il10	NM_010548	CAG-GGC-CCT-TTG-CTA-TGG-TG	CGG-CTG-GGG-GAT-GAC-AGT-AG
Lipe	NM_001039507,NM_010719	GTG-TGT-CAG-TGC-CTA-TTC-AG	GTC-AGC-TTC-TTC-AAG-GTA-TC
Lpl	NM_008509	GGT-CGA-AGC-ATT-GGA-ATC-CAG	TAG-GGC-ATC-TGA-GAA-CGA-GTC
Mttp	NM_008642,NM_001163457	GGA-GAA-GTA-ACC-TGA-ACA-TC	ACA-GGT-CTG-AGC-TGA-ACA-TC
Npc1l1	NM_207242	GCT-AGC-AGC-CAA-CAT-CAC-AG	CAG-TAG-GAG-GTA-GCA-GAC-CA
Nr1c1	NM_011144; NM_001113418.1	AAG-GGC-TTC-TTT-CGG-CGA-AC	GTT-CAT-GTT-GAA-GTT-CTT-CAG
Nr1c3	NM_001127330,NM_011146	TCT-CTC-CGT-AAT-GGA-AGA-CC	GCA-TTA-TGA-GAC-ATC-CCC-AC
Nr3c4	NM_013476.3	AGA-AGA-CCT-GCC-TGA-TCT-G	GCT-GGC-ACA-TAG-ATA-CTT-CTG
Nr1h3	NM_013839	CCG-GGA-AGA-CTT-TGC-CAA-AGC	GGA-GCT-GGT-CCT-GCA-CGT-TG
Nr1i2	NM_010936.3	AGG-AGG-AGT-ATG-TGC-TGA-TG	CTT-CAG-GAA-CAG-GAA-CCT-GTG
Nr1i3	NM_001243063;NM_001243062;NM_009803	GTC-CCA-TCT-GTC-CGT-TTG-C	AGG-GCT-TCT-GAC-AGT-ATC
Pnpla2	NM_025802,NM_001163689	TCA-TC-CAG-GCC-AAT-CTC-TGC	TGG-ATG-TTG-GTG-GAG-CTG-TC
Sar1b	NM_025535	ATT-GCT-GGC-ATG-ACG-TTT-AC	TGC-CAT-TGA-TAG-CAG-GAA-GG
Scd1	NM_009127	GAT-ACA-CTC-TGG-TGC-TCA-AC	AAC-GTG-GTG-AAG-TTG-ATG-TG
Slc2a2	NM_031197	TGG-GTA-CTC-TTC-ACC-AAC-TG	AGG-ATG-TGC-CAA-TGA-TCC-TG
Slc5a1	NM_019810	GCT-CCT-TGA-CCT-CCA-TCT-TC	CAG-GCA-ATG-CTG-ATG-CCA-AT
Slc27a4	NM_011989	GAC-ACC-TCA-AAG-GCA-CGA-GC	GAG-GG-TCC-AGA-TGC-TCT-GTG
Srebf1	NM_011480	ACG-GAG-CCA-TGG-ATT-GCA-CA	AAG-GGT-GCA-GGT-GTC-ACC-TT
Tnfa	NM_013693	CCA-GAC-CCT-CAC-ACT-CAG-ATC	CAC-TTG-GTG-GTT-TGC-TAC-GAC
Tbp	NM_013684	TGG-TGT-GCA-CAG-GAG-CCA-AG	TTC-ACA-TCA-CAG-CTC-CCC-AC
Ugt1a1	NM_201645	GCA-TCT-ATC-TGG-CTG-ATG-AG	CAG-AGG-CGT-TGA-CAT-AGG
Vnn1	NM_ 011704	CTG-AAG-TGT-TGC-TGA-GTG-AG	GAT-GCC-CAG-TCC-TTC-CCA-TA

1

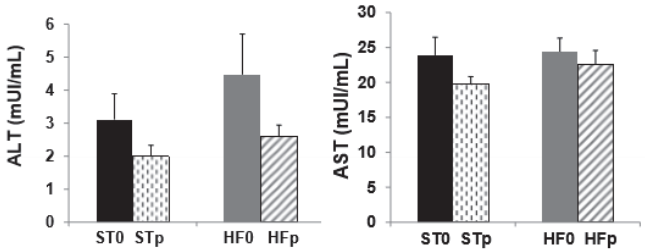
Supplementary Figures



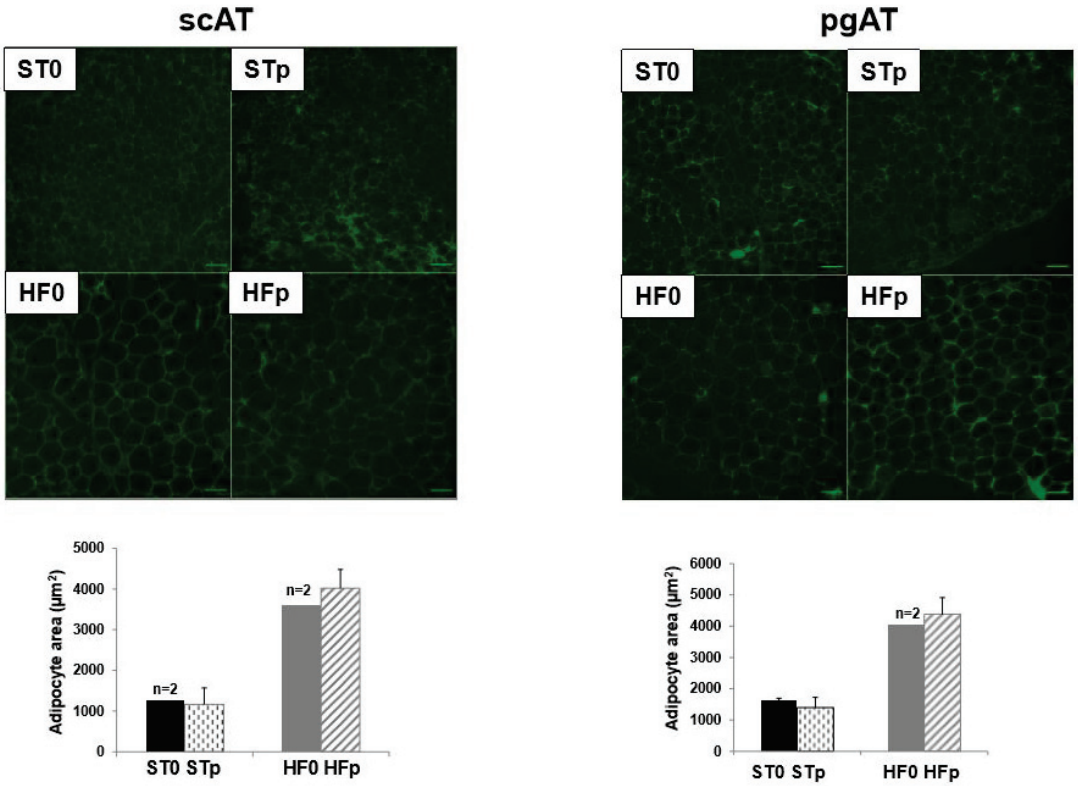
Supplementary Figure 1: (A) Body weight measured along the 15 weeks of diet **(B/C)** Tests performed after 13 wks of diet (Xylose absorption test) and after 14 wks of diet (Glucose tolerance test) **(D)** Plasma total cholesterol and cholesteryl esters and hepatic total cholesterol **(E)** HOMA-IR calculated from blood glucose and plasma insulin measurements.

Values are means ± SEM with n=8. ***P<0.001; ** P<0.01; *P<0.05

(F) Plasma measurement of leptin and adiponectin by ELISA. Results are expressed as means ± SEM. Significant differences were assessed after One-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test for leptin and overall HFHS effect by Two-way ANOVA using Bonferroni as post-hoc test for adiponectin. (*** P<0.001)



Supplementary Figure 2: Plasma measurement of Alanine Aminostransferase (ALT) and Aspartate Aminotransferase activities.
Values are means ± SEM with n=8.



Supplementary Figure 3: Representative laminin immunostaining of paraffin section of adipose tissues obtained from mice fed standard diet without (ST0) or with the pollutant mixture (STp), and mice fed high fat high sucrose diet without (HF0) or with the pollutant mixture (HFp). Adipose tissue acquisition is represented for subcutaneous (scAT) and perigonadal (pgAT) depots using objective x10. Scale bar=100µm. For adipocyte area measurement, at least 150 adipocytes for each sample were considered. Image analyses were performed with ImageJ software. Values are means ± SEM with n=3. When n=2, the value is the aryhtmetic mean.

22e Journée scientifique de l'EDISS – Villeurbanne, France (12/10/2017)

L'administration chronique d'un mélange de perturbateurs endocriniens à faible dose améliore le métabolisme des souris femelles en situation de déficience en œstrogènes.

Benoit Julien, Claudie Pinteur, Nathalie Vega, Emmanuel Labaronne, Hubert Vidal, Danielle Naville, Brigitte Le Magueresse-Battistoni

Univ-Lyon, laboratoire CarMeN, INSERM U1060, INRA U1397, Université Claude Bernard Lyon1, INSA Lyon, faculté de médecine Charles Mérieux, F-69600 Oullins, France

Les perturbateurs endocriniens (PE), de par leur capacité à mimer ou bloquer l'action des hormones, sont fortement suspectés dans l'étiologie de l'obésité et des troubles métaboliques associés. Précédemment, nous avions émis l'hypothèse qu'un mélange de 4 PE (TCDD, PCB153, DEHP et BPA) faiblement dosés pouvait induire des activités estrogéno-mimétiques dans un modèle d'exposition chronique chez la souris femelle. Sachant que les œstrogènes exercent des effets protecteurs contre les troubles métaboliques, nous supposons que l'exposition aux PE devrait atténuer les effets métaboliques délétères induits par une déficience en œstrogènes. Pour confirmer cette hypothèse, des souris femelles C57BL6/J ont été exposées, depuis le stade in utero jusqu'à 12 semaines de vie, à un régime enrichi en lipides et en sucrose contenant ou non les polluants. A 5 semaines les souris ont subi une chirurgie avec ou sans ablation des ovaires. La prise alimentaire a été mesurée toute les semaines et un test de tolérance au glucose a été réalisé après 16h de jeûne. Le sang a été recueilli pour effectuer des analyses biochimiques et les ARN ont été extraits du foie et du tissu adipeux puis analysés par RT-qPCR. Nos résultats montrent que l'exposition aux PE sur les souris ovariectomisées entraine une amélioration de certains paramètres métaboliques, avec une réduction de l'intolérance au glucose et de la résistance à l'insuline, une diminution du taux plasmatique de triglycérides, une augmentation de l'expression d'Esr1 (gène codant pour le récepteur alpha aux œstrogènes) dans le foie et une diminution de l'expression de la chimiokine MCP-1 / CCL2 dans le tissu adipeux. En conclusion, l'ensemble de ces observations suggère une activité estrogéno-mimétique des PE contribuant à l'amélioration du profil métabolique des souris dans des conditions de déficience en œstrogènes.

Metabolic effects of a mixture of low-dose pollutants in a mouse model of estrogen deficiency

B. Julien, C. Pinteur, N. Vega, E. Labaronne, H. Vidal, D. Naville, B. Le Magueresse-Battistoni ;

CarMeN laboratory, Inserm U1060, INRA U1397, Université Claude Bernard Lyon 1, Charles Mérieux Medical School, Oullins, France

Keywords: Environmental pollutants ; ovariectomy; estrogeno-mimetic; glucose tolerance ; fasting insulin

Background and aims: Solid evidences have demonstrated that environmental pollutants contribute to the etiology of obesity and related metabolic disorders. Using a model of lifelong exposure to a mixture of low-dose pollutants, we recently observed aggravation of glucose intolerance and hepatic insulin resistance of adult females but not of males fed a high-fat high-sucrose diet (HFSD). Conversely, lifelong exposure to the pollutant mixture induced alleviation of glucose intolerance and enhanced insulin sensitivity of immature female mice also HFSD-fed (all occurring in the absence of body weight changes). Thus, we hypothesized that the mixture of pollutants may induce estrogeno-mimetic activities. Indeed, it is well established that estrogens protect females against metabolic disorders at physiological levels but that insulin resistance develops following overstimulation of estrogen receptors or in conditions of estrogen deficiency. To further validate the hypothesis, we evaluated if the mixture of pollutants could alleviate the deleterious metabolic effects induced by ovariectomy.

Materials and methods: All procedures were performed with the approval of the Regional Committee of Ethics for Animal Experiments. C57BL/6J female mice were exposed from preconception until adulthood to a HFSD containing (HFp) or not (HF0) a mixture of persistent organic (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-ρ-dioxin, polychlorinated biphenyl 153) and short-lived (bisphenol A, diethylhexyl phtalate) pollutants, each used in the range of its tolerable daily intake reference dose. At 5 weeks of age, mice underwent ovariectomy (OVX) or were sham-operated, generating a total of 4 groups (HF0-sham/HF0-OVX/HFp-sham/HFp-OVX). Weight and food intake were weekly recorded. Several blood parameters, glucose tolerance, plasma lipids and hepatic expression of estrogen receptor α (Esr1) were measured.

Results: OVX resulted in body weight increase with no modification of food intake. Mice fed HFSD showed glucose intolerance and high plasma insulin levels which worsened in OVX mice. Pollutant exposure did not impact body weight, food intake or plasma insulin levels. However, it resulted in a decrease in plasma triglyceride level (0.71±0.019 mM vs 0.83±0.033 mM; p=0.008) and improvement of glucose tolerance in OVX females. In addition, fasting plasma insulin levels measured at the peak of response after the injection of glucose during the GTT (i.e. 15 minutes) were 1.6-fold higher in HFp-OVX mice than in HF0-OVX mice. This effect was not observed with sham mice. Thus, and although the pvalue=0.06, it may explain alleviation of glucose tolerance by pollutants in OVX conditions. Furthermore, in HFp-OVX mice, the mixture of pollutants led to a 1.4-fold increase in the expression of Esr1 gene (p=0.038) as compared to non-exposed mice that underwent OVX.

Conclusion: Collectively, these results illustrate the cocktail effect resulting from exposure to a mixture of environmental pollutants, each used at a dose supposedly without effect. Consistently with our working hypothesis on the estrogeno-mimetic activity of the mixture of pollutants, we observed beneficial metabolic effects of the pollutant mixture in conditions of estrogen deficiency. Because of

the very low doses of pollutants used in mixture, these findings may have strong implications in terms of understanding the potential role of environmental contaminants in the development of metabolic diseases.

EASD Lisbon – Portugal 2017

Print this Page for Your Records Close Window

Benoit JULIEN

Control/Tracking Number: A-17-2554-EASD
Activity: Abstract
Current Date/Time: 4/3/2017 1:52:01 AM

Metabolic effects of a mixture of low-dose pollutants in a mouse model of estrogen deficiency

Author Block: B. Julien, C. Pinteur, N. Vega, E. Labaronne, H. Vidal, D. Naville, B. Le Magueresse-Battistoni;
CarMeN laboratory, Inserm U1060, INRA U1397, Université Claude Bernard Lyon 1, Charles Mérieux Medical School, Oullins, France.

Abstract:

Background and aims: Solid evidences have demonstrated that environmental pollutants contribute to the etiology of obesity and related metabolic disorders. Using a model of lifelong exposure to a mixture of low-dose pollutants, we recently observed aggravation of glucose intolerance and hepatic insulin resistance of adult females but not of males fed a high-fat high-sucrose diet (HFSD). Conversely, lifelong exposure to the pollutant mixture induced alleviation of glucose intolerance and enhanced insulin sensitivity of immature female mice also HFSD-fed (all occurring in the absence of body weight changes). Thus, we hypothesized that the mixture of pollutants may induce estrogeno-mimetic activities. Indeed, it is well established that estrogens protect females against metabolic disorders at physiological levels but that insulin resistance develops following overstimulation of estrogen receptors or in conditions of estrogen deficiency. To further validate our hypothesis, we evaluated if the mixture of pollutants could reduce the deleterious metabolic effects induced by ovariectomy.

Materials and methods: This study has been carried out along the "Principles of laboratory animal care" (NIH Publication no. 85-23, revised 1985). C57BL/6J female mice were exposed from preconception until adulthood to a HFSD containing (HFp) or not (HF0) a mixture of persistent organic (TCDD, PCB 153) and short-lived (BPA, DEHP) pollutants, each used in the range of its tolerable daily intake reference dose. At 5 weeks of age, mice underwent ovariectomy (OVX) or were sham-operated, generating a total of 4 groups (HF0-sham/HF0-OVX/HFp-sham/HFp-OVX). Weight and food intake were weekly recorded. Several blood parameters, glucose tolerance, plasma lipids and hepatic expression of estrogen receptor α (Esr1) were measured.

Results: OVX resulted in body weight increase with no modification of food intake. Mice fed HFSD showed glucose intolerance and high plasma insulin levels which worsened in OVX mice. Pollutant exposure did not impact body weight, food intake or plasma insulin levels. However, it resulted in a decrease in plasma triglyceride level (0.71±0.019 mM *vs*

0.83±0.033 mM; p=0.008) and improvement of glucose tolerance in OVX females. In addition, fasting plasma insulin levels measured at the peak of response after the injection of glucose during the GTT (i.e. 15 minutes) were 1.6-fold higher in HFp-OVX mice than in HF0-OVX mice. This effect was not observed with sham mice. Thus, and although the *p*value=0.06, it may explain alleviation of glucose tolerance by pollutants in OVX conditions. Furthermore, in HFp-OVX mice, the mixture of pollutants led to a 1.4-fold increase in the expression of Esr1 gene (p=0.038) as compared to non-exposed mice that underwent OVX.

Conclusion: Collectively, these results illustrate the cocktail effect resulting from exposure to a mixture of environmental pollutants, each used at a dose supposedly without effect. Consistently with our working hypothesis on the estrogeno-mimetic activity of the mixture of pollutants, we observed beneficial metabolic effects of the pollutant mixture in conditions of estrogen deficiency. Because of the very low doses of pollutants used in mixture, these findings may have strong implications in terms of understanding the potential role of environmental contaminants in the development of metabolic diseases.

Metabolic effects of a mixture of low-dose pollutants in a mouse model of estrogen deficiency

B. Julien, C. Pinteur, E. Labaronne, N. Vega, H. Vidal, D. Naville, B. Le Magueresse-Battistoni

CarMeN laboratory, INSERM U1060, INRA U1397, Université Claude Bernard Lyon 1, Charles Mérieux Medical School, Oullins, France

Introduction

- Endocrine disrupting chemicals contribute to the aetiology of obesity and associated metabolic diseases through mechanisms related to their hormonal mimetic properties.
- Long-term exposition to a mixture of low-dose pollutants present in a high-fat high-sucrose diet (HFSD) leads to an aggravation of glucose intolerance with hepatic insulin resistance in adult female mice (Naville et al., FASEB, 2013). Conversely in immature female mice (with low circulating levels of estrogens), pollutants attenuate glucose intolerance and reduce insulin resistance in absence of body weight changes (Naville et al., PLoSOne, 2015).
- Estrogens protect females against metabolic disturbances linked to obesity.

➔ Hypothesis : The mixture may induce estrogeno-mimetic activities in ovariectomized (OVX) female mice.

Materials and Methods

The mixture of pollutants

2 persistant organic pollutants
Lipophilic + accumulation in food chain = bioaccumulation.
Found in many food resources and mainly in fatty-food.

2 short-lived pollutants
Ubiquitous because of their massive production in plastic industry.
Contamination from packaging (plastics) to its content (food, beverage).

Each pollutant was introduced into a HFSD at a dose close to its TDI*

	TCDD	PCB153	BPA	DEHP
Mixture	3 pg/kg	40ng/kg	5µg/kg	40µg/kg

Pollutants were solubilized in DMSO and corn oil. Same amount of diluent is added to the control food without pollutants

*TDI: Tolerable Daily Intake

Experimental design

Methods

Mice monitoring

Weight and food intake were recorded weekly.

Glucose homeostasis

After 16h of fasting, glucose tolerance was assessed by GTT.

Biochemical parameters

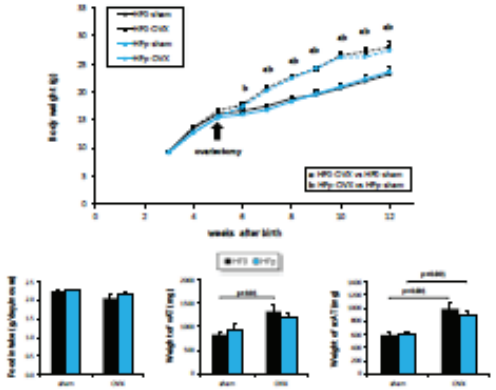
After 6h of fasting, retro-orbital blood was collected for measurement of glucose concentration and plasma levels of insulin, triglycerides and cholesterol.

mRNA expression

Total RNA was extracted from the frozen liver samples and then analysed by RT-qPCR with data normalized relatively to Gusb (beta-glucuronidase).

Results

1. Effects of ovariectomy but not pollutants on body weight



- **Increased bodyweight** depending on surgery (OVX vs sham operated), due to enhanced accumulation of fat mass, with **no modification of food intake**.
- Pollutants did not change any of these parameters.

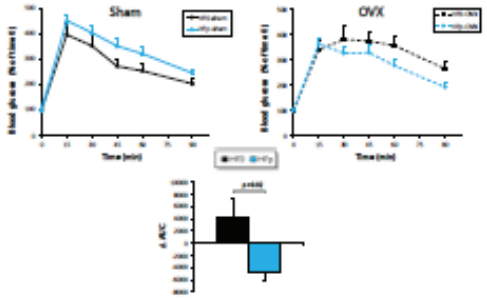
2. Insulin resistance and decreased in plasma levels of triglycerides in OVX mice exposed to pollutants

a: HFD OVX vs HFD sham
b: HFp OVX vs HFp sham
c: HFp OVX vs HFD OVX

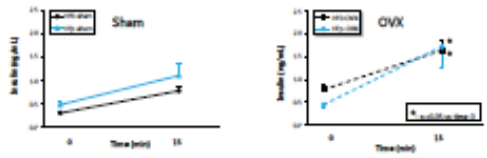
	Sham		OVX	
	HFD	HFp	HFD	HFp
Glucose (mM)	10,39 ± 0,7	9,75 ± 0,9	9,61 ± 0,6	9,53 ± 0,6
Plasma insulin (ng/mL)	0,26 ± 0,01	0,28 ± 0,03	0,58 ± 0,1*	0,50 ± 0,05*
HOMA-IR	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,26 ± 0,05*	0,22 ± 0,02*
Triglycerides (mM)	0,78 ± 0,05	0,72 ± 0,05	0,63 ± 0,03	0,71 ± 0,02*

- OVX mice: **higher** 6h-fasting plasma insulin level and HOMA-IR = **aggravation of high-fat induced insulin resistance. Pollutants did not change levels of plasma insulin.**
- **Decreased** plasma triglycerides in OVX mice exposed to pollutants.

3. Pollutants reduced hifh-fat induced glucose intolerance in a context of estrogen deficiency



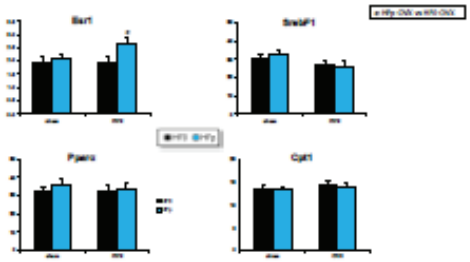
- Pollutants **aggravated glucose intolerance** in sham mice.
- Pollutants **alleviated glucose intolerance** in OVX mice.
- Significant **inversion** of the AUC profil between sham and OVX mice lifelong exposed to pollutants.



- **Lower** 16h-fasting plasma insulin level (time 0 of the GTT) in HFp-OVX vs HFD-OVX.
- **Better response to glucose** in pollutant-exposed females compared to non-exposed females (3.9-fold vs 2.5-fold) in conditions of estrogen deficiency.

➔ **Greater ability to produce insulin in response to glucose in HFp-OVX versus HFD-OVX mice.**

4. Increased mRNA expression of Esr1 in the liver of OVX mice exposed to pollutants



- **Increased** mRNA expression of Esr1 (gene encoding for the estrogen receptor alpha protein) with pollutants in conditions of estrogen deficiency
- **No effects** of pollutants on lipogenesis (Srebf1) and beta-oxydation (Ppara, Cpt1).

Conclusions

Results suggest that the mixture of low-dose pollutants leads to estrogeno-mimetic activities, improving metabolic status of mice with low circulating levels of estrogens: better glucose tolerance, lower 16h-fasting plasma insulin, decrease in plasma triglycerides and stimulation of hepatic Esr1 expression. These findings may have strong implications in terms of understanding the potential role of environmental contaminants in the development of metabolic diseases, specifically in females during menopausal transition.

This study is supported by INSERM and the University Claude Bernard Lyon 1 (doctoral award)

Contact : benoit.julien@univ-lyon1.fr; brigitte.lemagueresse@inserm.fr

Impacts métaboliques d'un mélange de perturbateurs endocriniens dans un modèle de souris ovariectomisées.

B. Julien, C. Pinteur, E. Labaronne, N. Vega, H. Vidal, D. Naville, B. Le Magueresse-Battistoni.

Introduction : Des études expérimentales solides montrent que les polluants seraient des facteurs étiologiques de l'épidémie d'obésité et des complications métaboliques associées. Nous avons montré qu'un mélange faiblement dosé de polluants de l'environnement perturbait le statut métabolique des souris exposées. En particulier, chez les femelles matures, on observe une aggravation de l'intolérance au glucose possiblement liée à une baisse de l'effet métabolique protecteur des œstrogènes. Comme certains polluants ont été décrits comme « œstrogéno-mimétiques », nous avons développé un modèle de souris ovariectomisées exposées ou non au mélange de polluants afin de mieux caractériser le potentiel œstrogéno-mimétique de ce mélange.

Matériels et méthodes : Le modèle expérimental développé est un modèle d'exposition chronique à un cocktail de 4 polluants (dioxine, PCB 153, Bisphénol A et phtalate) individuellement capables de perturbations métaboliques, largement présents dans l'alimentation et à large spectre d'action. Les doses utilisées pour chacun des 4 polluants sont de l'ordre de la dose journalière tolérable (DJT) c'est-à-dire la dose supposée sans effet adverse chez l'homme. Les polluants sont introduits dans une alimentation riche en gras et en saccharose. Celle-ci débute chez la mère avant l'accouplement et se poursuit jusqu'au stade adulte de la descendance. A 5 semaines d'âge, les souris sont réparties en 4 groupes après avoir subi (OVX) ou non (sham) une ovariectomie (± polluants ± OVX). Le statut métabolique, le poids et la prise alimentaire sont étudiés sur ces femelles.

Résultats : Après ovariectomie, le poids corporel des souris augmente sans modification de la prise alimentaire. Les souris étant sous régime gras-sucré, elles présentent une intolérance au glucose et une hyperinsulinémie qui sont aggravées après ovariectomie. L'exposition aux polluants chez les souris OVX se traduit par une diminution des triglycérides plasmatiques et une amélioration de l'intolérance au glucose sans modification du poids corporel ou de la prise alimentaire. A jeun, ces souris (OVX + polluants) ont une insulinémie diminuée sans modification de leur sensibilité à l'insuline en comparaison des souris ovariectomisées non exposées. Chez les souris OVX, le mélange des polluants entraine une augmentation significative de l'expression du récepteur alpha des estrogènes (récepteur aux estrogènes majoritaire dans le foie) en comparaison des souris ovariectomisées non exposées.

Conclusion : Ces résultats illustrent qu'un mélange de polluants chacun à des doses supposées sans effet est capable d'altérer le statut métabolique des souris exposées (effet cocktail). En condition d'ovariectomie (taux plasmatiques d'œstrogènes fortement diminués), les premiers résultats présentés ici suggèrent un effet œstrogéno-mimétique du mélange. Ceci se traduit par une amélioration de la tolérance au glucose et une augmentation de l'expression génique du récepteur alpha des œstrogènes, paramètres négativement impactés chez les souris matures exposées non opérées, présentant des taux d'œstrogènes normaux de souris adultes. Les effets des polluants sur le métabolisme dépendent ainsi du contexte hormonal des souris femelles.

Impacts métaboliques d'un mélange de perturbateurs endocriniens dans un modèle de souris ovariectomisées.

Benoit Julien, Claudie Pinteur, Emmanuel Laberonne, Nathalie Vega, Hubert Vidal, Danielle Naville, Brigitte Le Magueresse Battistoni

Univ-Lyon, laboratoire CarMeN, Inserm U1060, INRA U1397, Université Claude Bernard Lyon 1, INSA Lyon, Faculté de médecine Charles Mérieux, F-69600, Oullins, France

CA-200

Contexte

- Les polluants environnementaux contribueraient à l'épidémie d'obésité et des maladies métaboliques associées.
- L'exposition chronique à un mélange de polluants à faibles doses présents dans un régime riche en lipides et en glucides entraine des désordres métaboliques chez la souris femelle adulte (Naville et al., FASEB, 2013).
- Les œstrogènes protègent les femelles des complications métaboliques liées à l'obésité.

Problématique

Quel est le potentiel œstrogénique du mélange de polluants lorsque le niveau d'œstrogènes circulants est faible ?

Le mélange de polluants

Dioxine (TCDD) — PCB 153

2 polluants organiques persistants

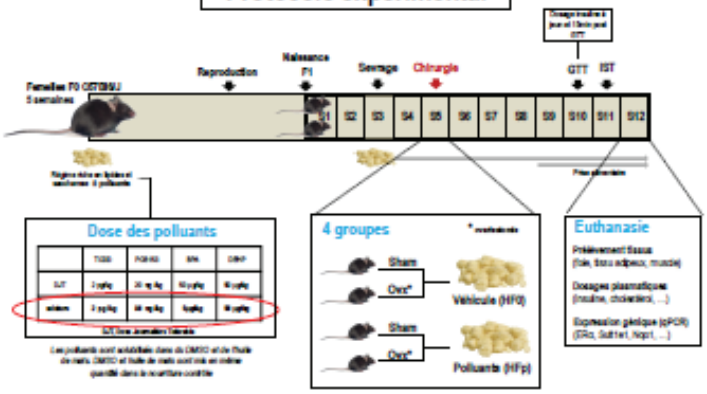
lipophiles → bioaccumulent au travers de la chaîne alimentaire → bioaccumulation; présents dans de nombreuses sources alimentaires mais surtout dans la nourriture grasse.

Bisphénol A (BPA) — Phtalate (DEHP)

2 polluants à demi-vie courte

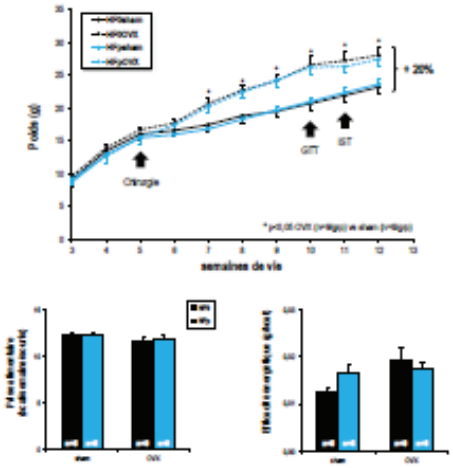
omniprésents de par leur production en masse dans l'industrie plastique; Contamination du contenant (plastique) au contenu (nourriture, boisson).

Protocole expérimental



Résultats

1. Augmentation du poids des souris ovariectomisées sans modification de la prise alimentaire ou de l'efficacité énergétique



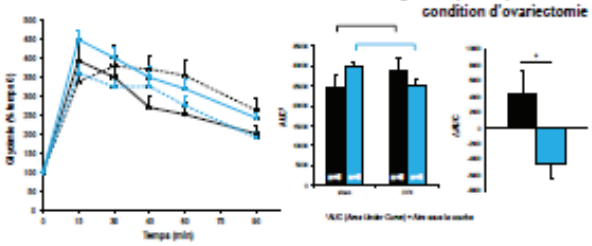
2. Insulino-résistance et diminution des triglycérides plasmatiques chez les souris ovariectomisées exposées au mélange de polluants.

	HF0 sham	HFp sham	HF0 OVX	HFp OVX
Glycémie (mM)	10,39 ± 0,7	9,75 ± 0,9	9,61 ± 0,6	9,53 ± 0,6
Insuline plasmatique (ng/mL)	0,26 ± 0,01	0,28 ± 0,03	0,58 ± 0,1***	0,5 ± 0,05***
HOMA-IR	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,26 ± 0,05*	0,22 ± 0,02**
Triglycérides (TG, mM)	0,78 ± 0,05	0,72 ± 0,05	0,63 ± 0,03	0,71 ± 0,02#

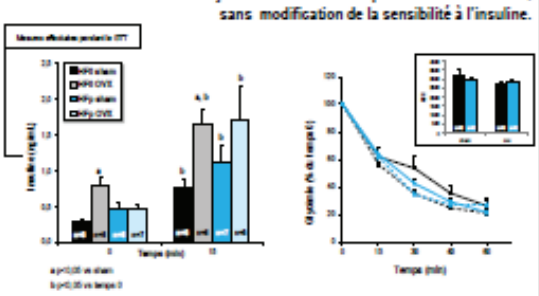
Moyennes ± SEM

Légendes

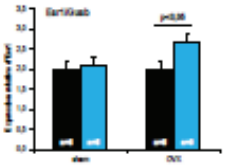
3. Diminution de l'intolérance au glucose par les polluants en condition d'ovariectomie



4. Insulinémie diminuée à jeun chez les souris HFp OVX versus HF0 OVX, sans modification de la sensibilité à l'insuline.



5. Augmentation de l'expression hépatique du gène codant pour le récepteur alpha aux œstrogènes (qPCR) avec les polluants en condition d'ovariectomie



Conclusions

Les résultats suggèrent que la mixture de polluants à faibles doses entraine un effet œstrogéno-mimétique améliorant le statut métabolique des souris ovariectomisées : meilleure tolérance au glucose, insulinémie à jeun diminuée, baisse des TG plasmatiques et stimulation de l'expression de Esr1.

Ce projet est soutenu financièrement par l'Inserm et l'université Claude Bernard Lyon 1 (contrat doctoral).

Contact : benoit.julien@univ-lyon1.fr

Impacts métaboliques d'un mélange de perturbateurs endocriniens dans un modèle de souris ovariectomisées.

Auteurs : B. Julien, C. Pinteur, E. Labaronne, N. Vega, H. Vidal, D. Naville, B. Le Magueresse-Battistoni.

Introduction : D'après l'organisation mondiale de la santé, les perturbateurs endocriniens (PE) sont définis comme : « des substances ou un mélange exogène, possédant des propriétés susceptibles d'induire une perturbation endocrinienne dans un organisme intact, chez ses descendants ou au sein de (sous)-populations». Si les PE affectent la reproduction, des études expérimentales récentes dont celles du laboratoire montrent que les polluants pourraient être aussi des facteurs étiologiques de l'épidémie d'obésité et des complications métaboliques associées (diabète). Au laboratoire, nous avons montré qu'un mélange de PE à faibles doses perturbait le statut métabolique des souris exposées, et que cet effet dépendait du sexe. Alors que chez les mâles c'est la voie de biosynthèse du cholestérol qui est ciblée, chez les femelles on observe une aggravation de l'intolérance au glucose possiblement liée à une baisse de l'effet métabolique protecteur des œstrogènes. En effet, l'expression de plusieurs gènes hépatiques impliqués dans le métabolisme des œstrogènes est altérée. Comme certains PE sont dits « œstrogéno-mimétiques », nous avons développé un modèle de souris ovariectomisées exposées ou non au mélange de PE afin de mieux caractériser le potentiel œstrogénique de ce mélange.

Matériels et méthodes : Des souris femelles C57Bl6/J sont exposées (ou non) à un mélange de 4 polluants (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine, PCB153, diethylhexyl-phthalate, BisphenolA) faiblement dosés. Après accouplement, la descendance est nourrie avec le même régime que la mère, du sevrage jusqu'à 12 semaines. A 5 semaines d'âge, les souris sont réparties en 4 groupes après avoir subi (OVX) ou non (sham) une ovariectomie (± polluants ± OVX). Le statut métabolique, le poids et la prise alimentaire sont étudiés sur ces femelles.

Résultats : Après ovariectomie, le poids corporel des souris augmente sans modification de la prise alimentaire. Cela s'accompagne d'une aggravation de l'intolérance au glucose. L'exposition aux polluants chez les souris OVX se traduit par une diminution de la triglycéridémie et une amélioration de l'intolérance au glucose. A jeun, ces souris (OVX + polluants) ont une insulinémie diminuée sans modification de leur sensibilité à l'insuline en comparaison des souris ovariectomisées non exposées.

Conclusion : Ces résultats suggèrent un effet œstrogéno-mimétique du mélange de PE qui est favorable au statut métabolique des souris OVX aux doses faibles utilisées. Ils mettent également bien en évidence la complexité de l'effet PE.

Impacts métaboliques d'un mélange de perturbateurs endocriniens dans un modèle de souris ovariectomisées.

Benoit Julien, Claudie Pinteur, Emmanuel Labaronne, Nathalie Vega, Hubert Vidal, Danielle Naville, Brigitte Le Magueresse Battistoni

Univ-Lyon, laboratoire CarMeN, Inserm U1060, INRA U1397, Université Claude Bernard Lyon 1, INSA Lyon, Faculté de médecine Charles Mérieux, F-69600, Oullins, France

fumées	2,3,7,8-tétrachlorodipenzo-p-dioxine (TCDD)	persistants	Tous de classes chimiques différentes Tous perturbateurs endocriniens Tous présents dans notre nourriture	
isolants électriques	Polychlorobiphényle (PCB) 153			
plastiques	Bisphénol A (BPA)	Non persistants		
plastiques	2-éthylhexyle phtalate (DEHP)			

Effets métaboliques

↗ intolérance au glucose

Altération expression hépatique de gènes œstrogéno-dépendants

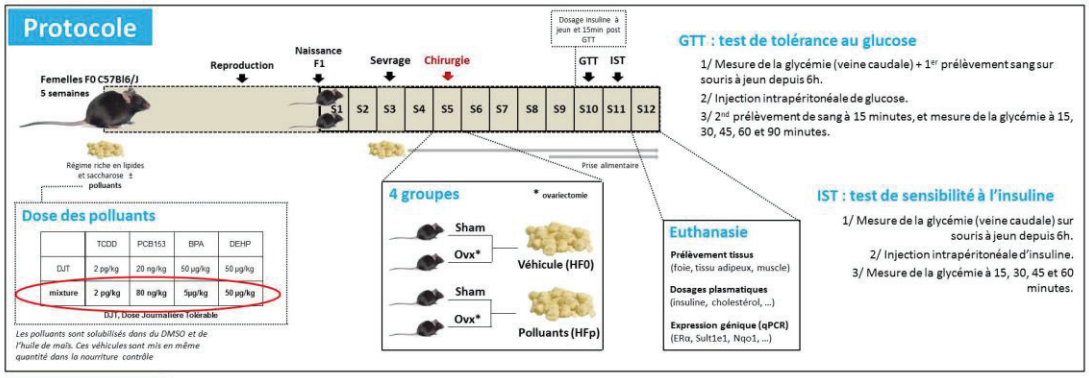
The FASEB Journal • Research Communication

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

Naville et al. *The FASEB J.* 2013

Quel est le potentiel œstrogénique du mélange de polluants ?

Protocole



Dose des polluants

	TCDD	PCB153	BPA	DEHP
DJT	2 pg/kg	20 ng/kg	50 µg/kg	50 µg/kg
mixture	2 pg/kg	80 ng/kg	5µg/kg	50 µg/kg

DJT, Dose Journalière Tolérable

Les polluants sont solubilisés dans du DMSO et de l'huile de maïs. Ces véhicules sont mis en même quantité dans la nourriture contrôle

GTT : test de tolérance au glucose

1/ Mesure de la glycémie (veine caudale) + 1er prélèvement sang sur souris à jeun depuis 6h.

2/ Injection intrapéritonéale de glucose.

3/ 2nd prélèvement de sang à 15 minutes, et mesure de la glycémie à 15, 30, 45, 60 et 90 minutes.

IST : test de sensibilité à l'insuline

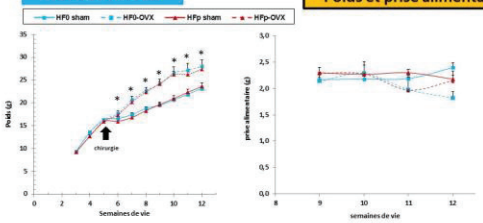
1/ Mesure de la glycémie (veine caudale) sur souris à jeun depuis 6h.

2/ Injection intrapéritonéale d'insuline.

3/ Mesure de la glycémie à 15, 30, 45 et 60 minutes.

Résultats

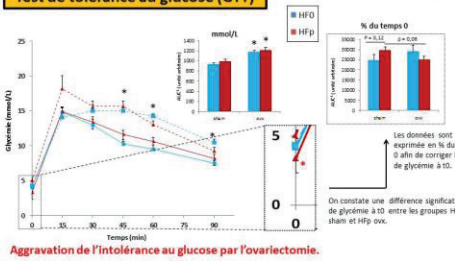
Poids et prise alimentaire



Augmentation du poids des souris ovariectomisées sans modification de la prise alimentaire.

Test de tolérance au glucose (GTT)

*AUC (*Area Under Curve*) = Aire sous la courbe



Tendance à l'amélioration de l'intolérance au glucose par les polluants chez les OVX.

Les données sont exprimée en % du temps 0 afin de corriger l'écart de glycémie à t0.

On constate une différence significative de glycémie à t0 entre les groupes HFp sham et HFp ovx.

Aggravation de l'intolérance au glucose par l'ovariectomie.

Paramètres biologiques

Moyennes ± SEM

	HF0 sham	HFp sham	HF0 ovx	HFp ovx
Glycémie (mM)	10,39 ± 0,7	9,75 ± 0,9	9,61 ± 0,6	9,53 ± 0,6
Insuline plasmatique (ng/mL)	0,26 ± 0,01	0,28 ± 0,03	0,58 ± 0,1***	0,5 ± 0,05***
HOMA-IR	0,12 ± 0,01	0,12 ±0,02	0,26 ± 0,05*	0,22 ±0,02**
Triglycérides (mM)	0,78 ± 0,05	0,72 ± 0,05	0,83 ± 0,03	0,71 ± 0,02#

Légendes

** : p<0,05 versus sham*

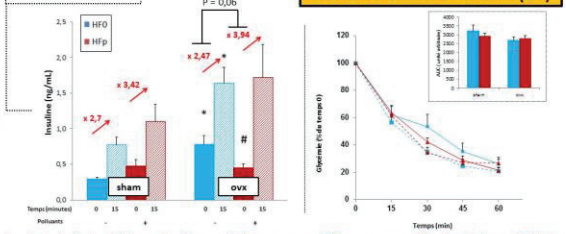
*** : p<0,01 versus sham*

**** : p<0,001 versus sham*

 # : p<0,05 versus HF0 ovx

Insulinorésistance chez les souris ovariectomisées, accompagnée d'une diminution des triglycérides plasmatiques lorsqu'elles sont exposées aux polluants.

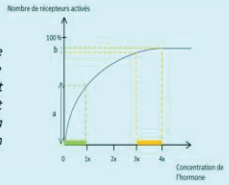
Test de sensibilité à l'insuline (IST)



Insulinémie diminuée à jeun chez les souris HFp ovx versus HF0 ovx, sans modification de la sensibilité à l'insuline.

Rappel sur l'effet hormonal

En fonction de la quantité initiale d'hormone, une même augmentation de concentration peut soit entrainer un effet significatif à faible concentration (vert), soit entrainer peu de variations si la concentration de l'hormone induit déjà un effet proche de l'effet maximal (jaune).



Conclusion

Les résultats suggèrent que la mixture de polluants à faibles doses entraine un effet œstrogéno-mimétique favorable au statut métabolique des souris ovariectomisées. Ils montrent également une partie de la complexité de l'effet des perturbateurs endocriniens sur l'organisme.

Ce projet est soutenu financièrement par l'université Claude Bernard Lyon 1 (contrat doctoral) .

Low-dose pollutants in mixture trigger metabolic effects common and distinct from œstradiol-17ß (E2) replacement in ovariectomized female mice

Benoit Julien, Claudie Pinteur, Nathalie Vega, Hubert Vidal, Danielle Naville and Brigitte Le Magueresse-Battistoni,

Affiliations: Univ-Lyon, CarMeN laboratory, INSERM U1060, INRA U1397, Université Claude Bernard Lyon1, INSA Lyon, **Charles Mérieux Medical School**, F-69600 Oullins, France

Corresponding author: Dr. B. Le Magueresse-Battistoni, PhD ; CarMeN laboratory, INSERM U1060, Faculté de Médecine Lyon-Sud, Chemin du Grand Revoyet, 69600 Oullins, France
Phone 33 (0)426235919, Fax 33 (0)426235916
E-mail : brigitte.lemagueresse@inserm.fr

Introduction: Populations vulnerable because of hormonal deficits, such as post-menopausal women, may be at particular risk when exposed to chemicals especially those endowed with endocrine disrupting activities. To gain further insight, we took advantage of a recently set-up mouse model in the laboratory consisting in a chronically exposure to low-dosed chemicals in mixture added to a high-fat-high-sucrose diet (HFHSD) and inducing sex-specific metabolic disturbances.

Methods: Five week-old C57Bl6/J mice were fed a HFHSD containing or not (control) a mixture of 2,3,7,8-TCDD (dioxin), polychlorobiphenyl (PCB)153, DEHP (phthalate) and bisphenol A at doses resulting in mice exposure at the Tolerable Daily Intake dose range (TDI) for each pollutant. Part of mice were ovariectomized (Ovx) by week 7. A subgroup of Ovx mice received implants filled with either vehicle or E2. Protocol lasted 15 weeks. Metabolic phenotyping (glucose tolerance test, glycaemia, plasma levels of insulin, leptin, triglycerides (TG), cholesterol, hepatic TG and cholesterol) and gene expression analysis of the liver and the adipose tissues by RT-qPCR were performed.

Results: Ovariectomy resulted in enhanced body weight and fat pads, glucose intolerance and insulin resistance normalized by E2 replacement but no TG accumulation. RT-qPCR analysis extended these data also showing in E2-replaced mice deregulated expression of Esr1 and of several genes involved in the control of cholesterol metabolism in the liver (Srebf2, Hmgcr, Cyp7a1). Estrogen (Esr1, Esr2, Gper1) and androgen (AR) receptors were distinctly regulated in Ovx mice but in a similar way within fat depots (subcutaneous, SAT and gonadic, VAT). In addition, regulation was inversed regarding adipogenesis markers (Fabp4, Lipe, Lpl) enhanced in SAT but not in VAT, and inflammatory markers (Tnfa, Il1b, Il12a) enhanced in VAT but not in SAT. Interestingly, pollutant exposure of Ovx mice resulted in enhanced Esr1 mRNA levels in SAT and enhanced Esr1/AR ratio in both fat pads thus copying E2 replacement. In the liver, genes impacted included Nr1h3, Nr0b2, Cd36 and Cyp7a1 but not Esr1 in a direction distinct from the one triggered by E2 replacement.

Conclusion: Because of the very low doses of pollutants used in the mixture, these findings may have implications in terms of understanding the potential role of environmental contaminants in the development of metabolic diseases, especially in females during the menopausal transition.

1. Conflict of interest: None disclosed
2. Funding: Research relating to this abstract was funded by INSERM to INSERMU1060. Benoit Julien is supported by a research fellowship from the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, France.

Diabetes & Metabolism 45 (2019) 160–166

Available online at
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com

Original article

Ghrelin concentration as an indicator of eating-disorder risk in obese women

S. Iceta [a,b,e,*], B. Julien [c], K. Seyssel [c], S. Lambert-Porcheron [c], B. Segrestin [a,c], E. Blond [d], P. Cristini [e], M. Laville [c,e], E. Disse [c,e]

[a] Centre référent pour l'anorexie et les troubles du comportement alimentaire (CREATyon), hospices civils de Lyon, 69500 Bron, France
[b] Inserm U1028, CNRS UMR 5292, équipe PSYR², Centre de recherche en neurosciences de Lyon (CRNL), centre hospitalier Le Vinatier, université Claude-Bernard-Lyon 1, 69500 Bron, France
[c] Unité Inserm U1060, Inra 1235, Insa-Lyon, centre de recherche en nutrition humaine Rhône-Alpes (CRNH-RA), centre européen nutrition et santé (CENS), laboratoire CarMeN, université Claude-Bernard-Lyon 1, 69310 Pierre-Bénite, France
[d] Service de biologie Sud, groupement hospitalier Sud, hospices civils de Lyon, Lyon, France
[e] Centre intégré de l'obésité Rhône-Alpes, fédération hospitalo-universitaire DO-iT, service d'endocrinologie et nutrition, groupement hospitalier Sud, hospices civils de Lyon, 69310 Pierre-Bénite, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 18 August 2017
Received in revised form 21 December 2017
Accepted 8 January 2018
Available online 30 January 2018

Keywords:
Drive for thinness
Eating disorders
Ghrelin
Impulsive behaviour
Obesity
Vulnerability

ABSTRACT

Aim. – Eating disorders (EDs), disordered eating (DE) and obesity are thought to have overlapping aetiological processes. DE in obesity can jeopardize weight-loss results, and acyl ghrelin (AG) is a hormone that stimulates food intake and reward processes. The main study objective was to determine whether higher-than-expected concentrations of AG in common obesity are associated with DE symptoms.

Methods. – The study population included 84 women, aged 20–55 years, free of established EDs: 55 were severely obese (OB) and 29 were of normal weight (NW). OB participants were stratified into two groups according to their median concentration of fasting AG distribution. The OB women with a high fasting plasma ghrelin concentration (HGC) were compared with both OB women with a low fasting plasma ghrelin concentration (LGC) and NW women. Participants were assessed by the Eating Disorder Inventory (EDI-2), Three-Factor Eating Questionnaire (TFEQ) and Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS). Fasting glucose, insulin, leptin and ghrelin plasma concentrations were also quantified.

Results. – Between the two AG groups of OB women, there was no statistical difference in either anthropometric or metabolic parameters, HADS, TFEQ or fasting hunger scores. However, the HGC group scored significantly higher than the LGC group on the drive-for-thinness subscale of EDI-2 (9.30 ± 0.99 vs. 6.46 ± 0.83, respectively; $P = 0.033$).

Conclusion. – Results support the hypothesis of a potential relationship between fasting plasma AG concentrations and ED risk, regardless of mood and anxiety. AG may be considered a potential biomarker of vulnerability for developing EDs.

© 2018 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Introduction

Obesity remains a major concern in patients with diabetes, and the management of obese patients is also still difficult, especially when associated with eating disorders (EDs) or disordered eating (DE). EDs have primarily been considered a psychiatric condition, whereas obesity has been regarded predominantly as a medical concern. However, there is now a widespread movement to consider EDs, DE and obesity as part of the same continuum of weight-related disorders. The basic components necessary for an integrated theory of DE and obesity include sociological and psychological parameters leading to the perception that "I am too fat" is a problem, maladaptive limitation of food intake (dietary restraint) to correct the problem, hunger (from eating less food) and the physiological reaction to hunger (hormonal control of food intake). To enhance preventative and interventional efforts, there is a strong need for early detection of psychological factors contributing to the development and maintenance of EDs and obesity.

* Corresponding author. Centre de référence pour les troubles du comportement alimentaire, hospices civils de Lyon, 59, boulevard Pinel, 69500 Bron, France.
E-mail address: sylvain.iceta@chu-lyon.fr (S. Iceta).

https://doi.org/10.1016/j.diabet.2018.01.006
1262-3636/© 2018 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

International Journal of Obesity
https://doi.org/10.1038/s41366-019-0360-x

ARTICLE

Behavior, Psychology and Sociology

Attentional bias and response inhibition in severe obesity with food disinhibition: a study of P300 and N200 event-related potential

Sylvain Iceta[1,2,3] · Julien Benoit[4] · Philippe Cristini[4] · Stéphanie Lambert-Porcheron[4] · Bérénice Segrestin[1,4] · Martine Laville[3,4] · Emmanuel Poulet[2] · Emmanuel Disse[3,4]

Received: 22 September 2018 / Revised: 5 February 2019 / Accepted: 24 February 2019
© Springer Nature Limited 2019

Abstract

Background/Objective In obesity there is growing evidence for common mechanism between food intake regulation and substance use disorders, especially more attentional bias and less cognitive control. In the present study we investigated whether severely obese subjects with or without disordered eating exhibit electroencephalographic (EEG) event-related potential (ERP) modifications as observed in substance abusers.

Subjects/Methods A total of 90 women were included; 30 in the normal-weight (NW) group ($18.5 < \text{BMI} < 24.5$ kg/m^2; no food disinhibition or restriction on the Three-Factor Eating Questionnaire) and 60 participants with BMI ≥ 35 kg/m^2 were separated into two groups ($n = 30$): without food disinhibition (disinhibition score ≤8; ObFD− group) and with food disinhibition (score >8; ObFD+). Clinical and metabolic parameters as well as compartmental aspects (Eating Disorders Inventory-2, EDI-2) were assessed. Participants underwent an ERP recording with an auditory oddball paradigm.

Results The mean ± SD P300 amplitudes in Pz were significantly ($p < 0.05$) lower in ObFD− (12.4 ± 4.6) and ObFD+ (12.5 ± 4.4) groups than in the NW group (15.8 ± 5.9). The mean ± SD N200 amplitude in Cz was significantly lower in the ObFD− group (−2.0 ± 5.4) than in the NW group (−5.2 ± 4.2 vs; $p = 0.035$). N200 Cz amplitude was correlated with EDI-2 Binge eating risk score ($\rho = 0.331$; $p = 0.01$), EDI-2 Body Dissatisfaction score ($\rho = 0.351$; $p = 0.007$), and Drive for Thinness score ($\rho = 0.26$; $p = 0.05$).

Conclusions The present study provides evidence for reduction of P300 and N200 amplitude in obese women and that N200 amplitude may be related to more disordered eating and eating disorder risk. This leads to consider attentional bias and response inhibition as core mechanisms in obesity and as possible targets for new therapeutic strategy.

Introduction

The determinants of food intake, although increasingly well known, are still difficult to apprehend especially in patients suffering from obesity. Despite the widespread availability of food in industrial countries, only certain individuals will develop disordered eating and obesity, and ultimately food addiction [1]. Mechanisms that mediate the transition from controlled food use to impaired control are still a matter of investigation. The emerging hypothesis of food addiction suggests an important role of impulsivity (or lack of inhibition) [2], reward system functioning [3], and cognitive control [4] in food intake disorders. Although food addiction remains a controversial concept, there is growing evidence of behavioral and neurobiological overlaps between food intake regulation in obesity and substance use disorders (SUD). For instance, in both obesity and SUD the saliency of a specific type of reward (food or

✉ Sylvain Iceta
sylvain.iceta@chu-lyon.fr

1 Centre Référent pour l'Anorexie et les Troubles du Comportement Alimentaire (CREATYON), Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

2 INSERM U1028, CNRS UMR5292, Université Claude Bernard Lyon 1, Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon (CRNL), Equipe PSYR2 Centre Hospitalier Le Vinatier, Lyon, France

3 Centre Intégré de l'Obésité Rhône-Alpes; Fédération Hospitalo-Universitaire DO-iT, Service Endocrinologie-Diabète-Nutrition, Université de Lyon, Groupement Hospitalier Sud, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

4 Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes, Univ-Lyon, CarMeN Laboratory, Université Claude Bernard Lyon1, Hospices Civils de Lyon, CENS, FCRIN/FORCE Network, Pierre Benite, France

Published online: 09 April 2019