

## PESTIFAT

### Effets d'une exposition chronique à faible dose d'un cocktail de pesticides sur l'accumulation hépatocytaire de lipides et le métabolisme des xénobiotiques

#### 1. Contexte scientifique

##### Exposition chronique de la population aux faibles doses de pesticides en cocktail et effets hépatiques

L'exposition aux pesticides et leurs effets sur la santé humaine est un problème de santé publique majeur. En 2017, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) reconnaît que des résidus de pesticides ont été détectés dans plus de 46 % des 84341 échantillons d'aliments analysés à travers l'Union européenne et les pays tiers. De multiples résidus ont été trouvés dans 28 % des échantillons analysés, parmi lesquels plus d'un tiers contenaient plus de 4 résidus de pesticides (EFSA 2017).

Cependant, la procédure d'homologation des produits phytopharmaceutiques est basée sur des études de toxicologie individuelle de la substance active et aucune procédure internationalement acceptée n'existe à ce jour pour évaluer l'exposition cumulative aux résidus multiples de pesticides, à l'exception de quelques groupes de pesticides partageant une dose journalière admissible (DJA) de groupe. Il est donc admis que le mélange de pesticides aux doses inférieures à leur NOAEL (*No observable Adverse Effect Level*) n'a pas d'effet néfaste. Toutefois, le règlement (CE) n° 396/2005 reconnaît que les consommateurs sont exposés à de multiples résidus présents dans les aliments consommés lors d'un repas, au cours d'une journée ou sur une période plus longue qui peut conduire à des effets cumulatifs sur la santé humaine. **Les effets possibles d'expositions à faibles doses quotidiennes à ces cocktails de pesticides demeurent inconnus.**

L'hypothèse peut être ainsi émise que pour mieux évaluer l'exposition réelle et déterminer l'existence éventuelle d'un risque pour la santé humaine, **il est nécessaire de tester de faibles doses de mélanges de pesticides appartenant à différentes familles ayant des mécanismes similaires ou différents. Cette exposition complexe pourrait conduire à des effets additifs insidieux significativement différents de ceux observés avec un seul type de pesticide.**

Des mélanges de pesticides peuvent induire des interactions entre les produits eux-mêmes, des interactions toxico-cinétiques et toxico-dynamiques au même titre que des interactions médicamenteuses. Pour pouvoir interpréter ces interactions, il est nécessaire d'avoir une bonne compréhension de la réactivité chimique, de la toxico-cinétique (y compris les voies métaboliques) et des mécanismes d'action de chaque composé (IGHRC, 2009). L'exposition à plusieurs pesticides peut en effet provoquer des modifications de la toxicocinétique de composés individuels, modifiant ainsi la toxicité prédite. Les interactions toxicocinétiques correspondent à une modification de l'absorption, de la distribution, du métabolisme ou de l'élimination (Reffstrup et al., 2010), qui peuvent se produire à toutes les doses.

La plupart des pesticides sont métabolisés au niveau hépatique par les cytochromes P450 (CYPs) mais cette biotransformation, généralement considérée comme une détoxification, peut parfois conduire à une bioactivation. Elle sera d'autant plus importante qu'il s'agit de mélanges du fait d'interactions et d'inductions/inhibitions de ces enzymes. A titre d'exemple, on peut citer le chlorpyrifos qui augmente la toxicité de deux pyréthrinoïdes en inhibant les carboxylesterases (CEs) via son métabolite oxon et ainsi en inhibe leur élimination. Le chlorpyrifos-oxon empêche également l'hydrolyse de la perméthrine et donc son élimination, potentialisant son effet toxique (Choi et al., 2004; Hodgson and Rose, 2007). D'autres organophosphorés thiolés comme le malathion et le diazinon sont connus pour inhiber l'activité des CYPs de

manière irréversible empêchant ainsi la détoxification du carbaryl. La seule voie possible d'élimination est celle des CEs elles-mêmes inhibées ensuite par les métabolites oxons (Tang et al., 2002; Hodgson and Rose, 2007). **Ainsi certains effets cocktails de pesticides ne peuvent être définis sur la simple base d'additivité des effets.** Par exemple, Yang et ses collaborateurs ont montré qu'un cocktail de pesticides induisait des dommages oxydatifs dans le foie de rats et que cette réponse ne constituait pas la somme des réponses produites par chaque pesticide (Yang et al., 2011).

Le foie est non seulement l'organe principal de métabolisation des xénobiotiques mais il est également une cible majeure concernant leur toxicité. Dans le contexte d'exposition chronique, les xénobiotiques peuvent entraîner différents types de lésions hépatiques telles qu'une stéatose hépatique (accumulation de lipides), stéatohépatite (stéatose associée à une nécro-inflammation), cirrhose, cholestase et granulome ou un carcinome hépatocellulaire (CHC) (Fromenty et Pessayre, 1995 ; Heindel et al., 2017 ; Ledda et al., 2017). Parmi ces différentes lésions, la stéatose est particulièrement importante à étudier car, qu'elle que soit sa cause, cette lésion peut évoluer en stéatohépatite, cirrhose et CHC (Fromenty et Pessayre, 1995 ; Begriche et al., 2011; Ledda et al., 2017 ; Heindel et al., 2017). De plus, cette lésion est fréquemment induite par un grand nombre de xénobiotiques (Fromenty et Pessayre 1995 ; Wahlang et al., 2013 ; Ledda et al., 2017).

#### Xénobiotiques et stéatose hépatique

La stéatose hépatique est une lésion qui peut être induite par de nombreux médicaments, l'alcool éthylique, des toxines végétales et des contaminants de l'environnement tels que le bisphénol A, des métaux lourds et des pesticides (Fromenty et Pessayre, 1995 ; Begriche et al., 2011; Wahlang et al., 2013 ; Al-Eryani et al., 2015 ; Heindel et al., 2017). L'inhibition de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale des acides gras est un mécanisme fréquent par lequel les xénobiotiques peuvent induire une stéatose hépatique (Fromenty et Pessayre, 1995; Labbe et al., 2008 ; Begriche et al., 2011). L'évolution de la stéatose en stéatohépatite est quant à elle observée avec des xénobiotiques altérant la chaîne respiratoire mitochondriale ce qui favorise la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Fromenty et al., 1997 ; Begriche et al., 2011). En effet, ces ERO générées au niveau mitochondrial sont capables d'initier les processus d'inflammation et de fibrose hépatique (Garcia-Ruiz et al., 2006; Mitchell et al. 2009; Satapati et al., 2015). L'inhibition de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale et les altérations de la chaîne respiratoire peuvent également induire une nécrose hépatocytaire (Fromenty et Pessayre, 1995; Begriche et al., 2011). **Cependant, il est important de souligner que le rôle de la dysfonction mitochondriale dans l'apparition de la stéatose et la stéatohépatite a été très peu étudié pour les pesticides contrairement à d'autres xénobiotiques tels que les médicaments et l'alcool.**

#### Obésité, NAFL et toxicité des xénobiotiques

L'obésité et le surpoids, qui touchent une proportion importante de la population dans de nombreux pays, sont très fréquemment associés à une stéatose hépatique, dénommée NAFL (nonalcoholic fatty liver) par les anglo-saxons (Begriche et al., 2013). Il existe maintenant différentes investigations montrant que des xénobiotiques peuvent être particulièrement hépatotoxiques dans le contexte de l'obésité et de la stéatose associée. En particulier, ces xénobiotiques peuvent non seulement aggraver la stéatose préexistante (i.e. accumulation plus importante de lipides hépatiques) mais également favoriser la progression de la simple stéatose en stéatohépatite non-alcoolique (NASH). C'est le cas par exemple de certains médicaments tels que le méthotrexate et l'irinotécan (Fromenty, 2013; Massart et al., 2017), de l'alcool éthylique (Hart et al., 2010 ; Mahli et al., 2016) et de contaminants de l'environnement tels que des polychlorobiphényles (PCB) et la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD) (Shi et al., 2012 ; Wahlang B et al., 2014 ; Duval et al., 2017).

Mailloux et ses collaborateurs ont montré qu'un mélange contenant diverses familles de pesticides et d'autres contaminants détectés dans le sang des Inuits exacerbait une stéatose hépatique existante chez le rat obèse (Mailloux et al., 2014). La progression de la simple stéatose en NASH est particulièrement problématique chez les patients obèses car cette pathologie peut elle-même évoluer en cirrhose et en carcinome hépatocellulaire (Begrice et al., 2013 ; Arab et al., 2018). De plus, il est important de noter que la stéatose et la NASH peuvent augmenter le risque d'apparition de maladies cardiovasculaires, cérébrovasculaires et rénales chez les sujets obèses (Bonnet et al., 2017; Han and Lee, 2017). Concernant les mécanismes, la dysfonction des mitochondries hépatiques induite par certains xénobiotiques semble être également impliquée (Xu et al., 2011 ; Mailloux et al., 2014 ; Massart et al., 2017). En effet, tandis que l'inhibition de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale des acides gras va accroître l'accumulation préexistante des triglycérides, les altérations de la chaîne respiratoire pourraient favoriser la transition de la simple stéatose vers la NASH (Fromenty, 2013; Massart et al., 2017).

Il est également important de souligner que la stéatose liée à l'obésité (NAFL) est associée chez les patients à une modification de l'expression et de l'activité de certaines enzymes hépatiques de biotransformation des xénobiotiques et en particulier de CYPs tels que le CYP2E1 (augmenté) et le CYP3A4 (diminué) (Aubert et al., 2011; Michaut et al., 2014 ; Cobbina et Akhlaghi, 2017). Ces modifications expliquent par exemple la toxicité accrue du paracétamol et de l'alcool éthylique dans un contexte d'obésité et de stéatose hépatique associée (Aubert et al., 2011; Mahli et al., 2015). Concernant le paracétamol, nous avons montré au laboratoire que l'hépatotoxicité accrue de ce médicament pouvait être observée non seulement sur des modèles de souris obèses (Aubert et al., 2012), mais également sur un modèle cellulaire de stéatose liée à l'obésité basé sur une surcharge des cellules HepaRG en acides gras (Michaut et al., 2016). Les modifications de l'activité du CYP2E1 et du CYP3A4 observées dans ce modèle (Michaut et al., 2016), ainsi que dans un modèle modifié plus récent (Le Guillou et al., 2018, cf. Figure 1), montrent que ces modèles *in vitro* sont capables de reproduire les altérations des CYPs rapportées chez les patients obèses (Aubert et al., 2011; Michaut et al., 2014 ; Cobbina et Akhlaghi, 2017).

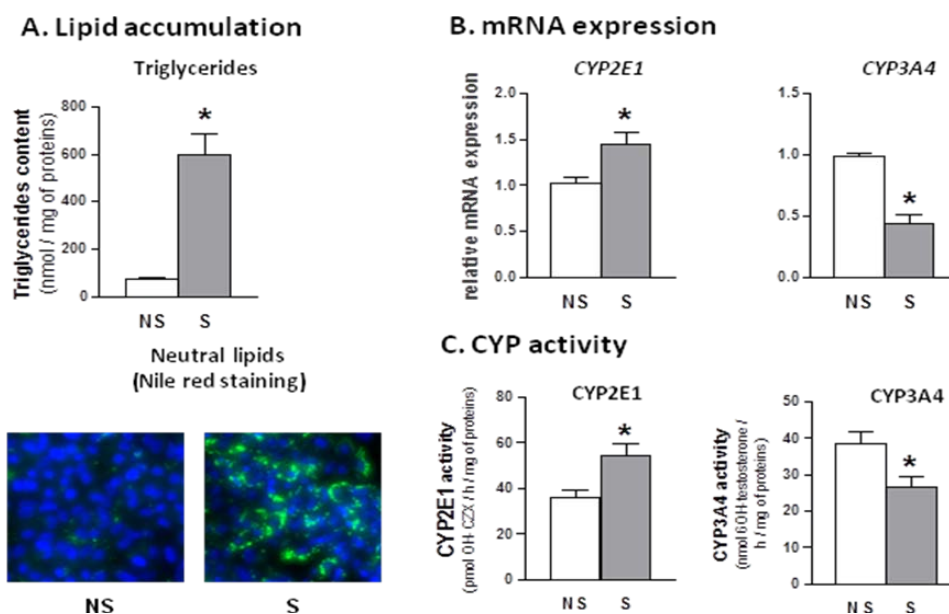


Figure 1 : Principales caractéristiques de la stéatose induite *in vitro* sur les cellules HepaRG. Certains paramètres liés à la stéatose sont comparés dans les cellules non stéatosées (NS) et stéatosées (S). Accumulation des triglycérides et des lipides neutres(A). Modulation des expressions géniques (B) et des activités des CYP2E1 et 3A4 (C). Adapté d'un article actuellement en révision (Le Guillou et al., JPET)

**Ainsi, certains pesticides pourraient non seulement entraîner une stéatose hépatique sur foie sain mais également aggraver les pathologies hépatiques préexistantes chez les sujets obèses.** Etant donné le rôle majeur des dysfonctions mitochondriales dans l'apparition des stéatoses et des stéatohépatites (Begrache et al., 2011 ; Begrache et al., 2013 ; Massart et al., 2017), cet aspect physiopathologique sera particulièrement abordé dans notre projet. La métabolisation de certains pesticides et l'activité de plusieurs CYPs (CYP2E1 et CYP3A4 notamment) seront également prises en compte puisque la stéatose liée à une surcharge lipidique est susceptible de modifier ces paramètres (Figure 1).

#### Données d'exposition et de toxicologie concernant les pesticides sélectionnés pour PESTIFAT

Dans le projet PESTIFAT, nous avons choisi de tester un mélange de pesticides qui sont fréquemment détectés comme résidus dans les aliments afin d'imiter l'exposition réelle de la population générale à travers la consommation alimentaire. À cette fin, nous avons utilisé des données estimées sur l'exposition humaine fondées sur l'évaluation européenne des résidus de pesticides dans les aliments publiée par l'EFSA (2010, 2013). Nous avons sélectionné 7 pesticides fréquemment détectés dans les échantillons d'aliments : le chlorpyrifos-éthyle, le diméthoate, le diazinon, l'iprodione, l'imazalil, le manèbe et le mancozèbe. Les résultats du rapport de l'EFSA ont montré que la plupart de ces pesticides dépassait les limites maximales de résidus pour certains échantillons d'aliments (chlorpyrifos-éthyle, diméthoate, diazinon, iprodione et imazalil).

En outre, la surveillance des résidus de pesticides réalisée en 2006 par la Commission des Communautés Européennes (CCE, 2008) a montré que l'imazalil, le chlorpyrifos, l'iprodione et les dithiocarbamates (manèbe et mancozèbe) sont retrouvés comme résidus multiples sur les échantillons de fruits et légumes. D'autre part, l'ANSES a récemment classé le chlorpyrifos-éthyle, l'iprodione et l'imazalil parmi les pesticides les plus importants dans les aliments et a montré que le diméthoate a été détecté à des niveaux dépassant les valeurs toxicologiques de référence [Anses, 2011].

Des travaux récents *in vitro* et *in vivo* sur des cellules souches mésenchymateuses (Hochane et al., 2017) ont montré un effet sur la progression tumorale suite à une exposition chronique à ce mélange de pesticides. Dans le cadre d'un projet financé en 2017 par le Cancéropôle Grand-Ouest (projet PeNiCa,) portant sur les effets de ce mélange de pesticides sur les cellules de la niche tumorale, notre laboratoire étudie actuellement l'impact de ce cocktail sur la prolifération/différenciation hépatocytaire. Les 1<sup>ers</sup> résultats indiquent que ce cocktail n'aurait pas d'impact sur la prolifération mais altérerait la différenciation des cellules HepaRG.

Le projet PeNiCa porte sur les aspects potentiellement cancérigènes de ce cocktail mais ne prend toutefois pas en compte son implication éventuelle dans l'apparition et/ou l'aggravation d'une stéatose, ni l'influence de celle-ci sur la toxicocinétique de ces molécules. Or certains composés de cette liste sont connus pour induire à la fois des troubles du métabolisme lipidique, un stress oxydatif et des modifications du métabolisme hépatique des xénobiotiques. Une étude récente chez la souris, a permis de démontrer que le chlorpyrifos induisait des perturbations métaboliques et notamment des voies de signalisation de l'insuline et de la leptine (Peris-Sampedro et al., 2018). Ce même composé, en cocktail parmi d'autres pesticides, inhibe des enzymes du métabolisme tel que le CYP2B6 (Spaggiari et al., 2016). Le diméthoate, lorsqu'il est administré à faible dose chez le rat et perturbe les fonctions hépatiques ainsi que le métabolisme des lipides et des glucides (Feng et al., 2012). L'iprodione quant à lui induit une réponse inflammatoire sur les cellules HepG2 (Washington et Tchounwou, 2004). Des analyses biochimiques et transcriptomiques menées sur les souris après une administration chronique de faibles doses d'imazalil ont démontré des désordres du

métabolisme des acides biliaires, un stress oxydant et une altération du métabolisme hépatique des xénobiotiques (Jin et al., 2018). Enfin, le fongicide mancozèbe exacerbe la stéatose dans un modèle cellulaire (HepG2) de NAFL (Pirozzi et al., 2016). **Ces éléments laissent penser que ce cocktail de 7 substances actives pourrait induire une toxicité hépatique après une exposition chronique et que ces effets délétères pourraient être exacerbés dans un contexte de stéatose liée à l'obésité (NAFL).** Cependant, il est important de noter qu'il existe actuellement peu de données expérimentales publiées sur ces aspects toxicologiques. De plus, les résultats des études réalisées sur les cellules HepG2 sont critiquables car ces cellules expriment peu (ou pas) les enzymes impliquées dans la biotransformation des xénobiotiques contrairement au modèle HepaRG (Yokoyama et al., 2018).

## 2. Description du projet – objectif du projet

Compte tenu des différents éléments développés ci-dessus, les objectifs du projet visent à répondre à deux questions importantes en utilisant le modèle cellulaire HepaRG :

1. Quel est l'impact de ces molécules à faible dose individuellement et en mélange sur l'apparition d'une stéatose ou l'aggravation de cette lésion ?

Ce premier objectif permettra de mieux appréhender les effets des pesticides individuellement et en mélange après une exposition chronique et de déterminer si l'état pathologique tel que la NAFL peut influencer les effets toxicologiques des substances actives. Il permettra également de déterminer si le cocktail peut aggraver la NAFL liée à l'obésité ou favoriser la progression de cette lésion en NASH.

2. Quel est l'impact de ces 7 molécules sur le métabolisme des xénobiotiques et en particulier sur l'activité des CYPs et les biocinétiques de disparition des substances actives du cocktail ?

Ce second objectif permettra de déterminer l'influence du mélange, de l'exposition chronique et de la stéatose sur la toxicocinétique des pesticides.

L'impact attendu de ce projet est une meilleure compréhension des effets de santé des produits phytosanitaires en prenant en compte la notion d'exposition chronique à de faible dose de mélanges de substances sur une population à risque de développer des pathologies métaboliques et cardiovasculaires.

De plus, la mise en évidence des métabolites hépatiques dans ce projet pourrait aussi conduire à élargir la liste des produits de dégradation des pesticides retrouvés dans l'environnement et notamment les milieux aquatiques.

## 3. Description du projet – Méthodes du projet

Le projet PESTIFAT sera réalisé en 3 phases, chacune déterminée par un objectif bien défini. La **tâche 0** permettra de déterminer les doses d'exposition au cocktail de pesticides pour notre étude, qu'elles soient à la fois pertinentes vis-à-vis de l'exposition humaine et appropriées pour les études de mécanistique. **Les tâches 1 et 2** seront conduites en parallèle pour répondre aux deux principaux objectifs du projet.

Afin de répondre aux objectifs, le laboratoire dispose d'un modèle hépatocellulaire métaboliquement compétent qui peut être maintenu pendant plusieurs semaines : la lignée HepaRG (Aninat et al., 2006 ; Josse et al., 2008 ; Savary et al., 2015). Différenciées, les cellules HepaRG expriment des ARNm spécifiques du foie (e.g. albumine, aldolase B), les CYPs, les enzymes de phase II (e.g. UGT1A1, GSTA4, GSTA1/A2, GSTM1), les transporteurs apicaux et basolatéraux et les récepteurs nucléaires (e.g. CAR, AhR, PXR, PPAR). Les taux de

transcrits de ces marqueurs ainsi que les activités des CYPs sont comparables à ceux dans les cultures primaires d'hépatocytes humains (Aninat et al., 2006 ; Yokoyama et al., 2018). Une étude menée au laboratoire a déjà permis de mettre en évidence des effets non prévisibles sur la simple base de l'additivité (synergique et antagoniste) après des expositions aiguës et chroniques à un mélange de deux pesticides (Savary et al. 2015).

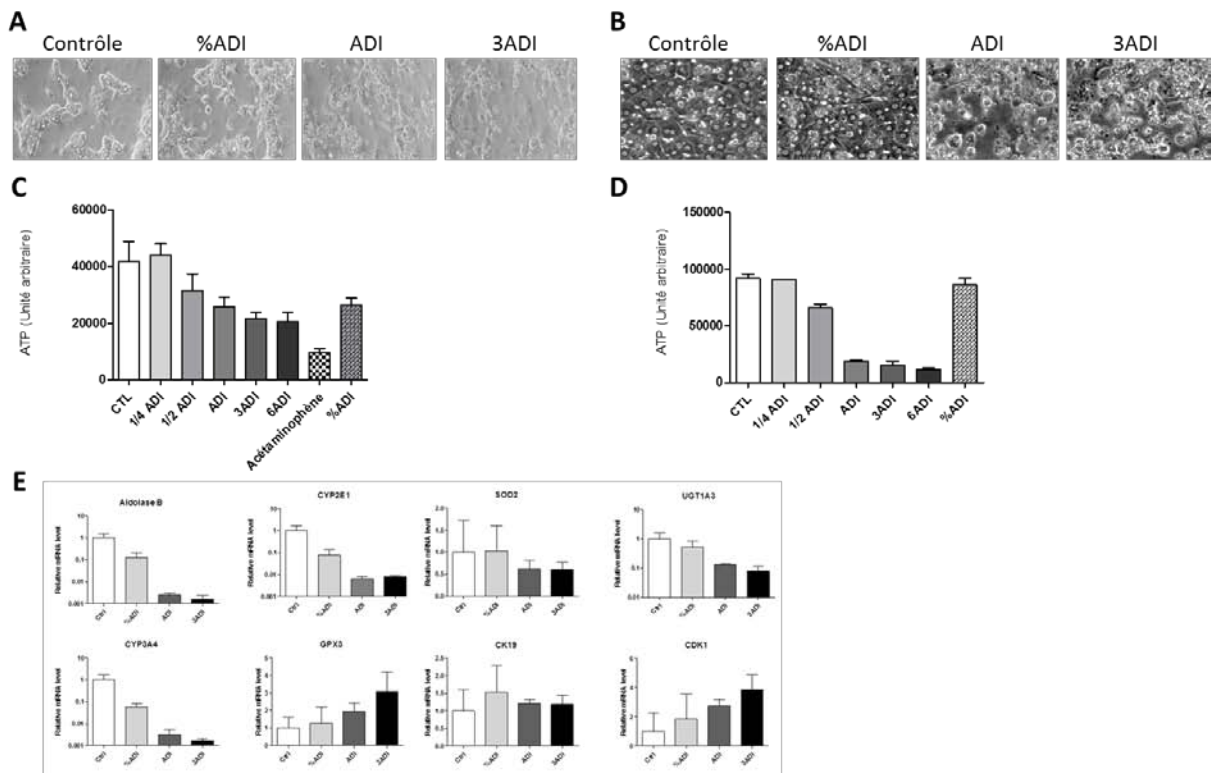
Un modèle physiopathologique de NAFL sur 7 jours a également été mis en place au laboratoire sur les cellules HepaRG afin d'étudier la toxicité du paracétamol (Michaut et al, 2016). Ce modèle a été récemment adapté pour une exposition plus longue et consiste à exposer pendant 14 jours les cellules HepaRG différenciées à un mélange d'acides stéarique (150  $\mu$ M) et oléique (150  $\mu$ M). Notre équipe a ainsi validé ce modèle de stéatose chronique en vérifiant certains paramètres tels que l'accumulation de triglycérides, l'augmentation de l'activité du CYP2E1 et l'inhibition de celle du CYP3A4 (Figure 1, Le Guillou et al., 2018). Ce modèle a permis d'étudier l'impact de la stéatose hépatique sur la toxicité mitochondriale médicamenteuse (Le Guillou et al., 2018,) mais également de comprendre des effets exacerbés par le benzo[a]pyrene et l'alcool éthylique (Bucher et al., 2018).

### Tâche 0 : Détermination des doses faibles d'exposition

Dans le cadre du projet collaboratif PeNiCa, notre laboratoire expose actuellement les cellules HepaRG à trois concentrations de ce mélange de ces 7 pesticides :

1. Concentrations extrapolées à partir de l'exposition réelle de la population (sur la base du rapport de l'EFSA, voir ci-dessous).
2. Concentrations extrapolées à partir de la DJA pour chaque pesticide, définie comme la quantité d'un produit chimique pouvant être ingéré quotidiennement par l'être humain (mg / kg pc / jour) sans risque pour la santé.
3. Concentrations correspondant à 3 fois les valeurs de la DJA pour déterminer des effets doses-réponses et évaluer ainsi si les effets sont dépendants de l'exposition.

Les résultats préliminaires montrent que les expositions aiguës des cellules HepaRG différenciées et des hépatocytes humains primaires au cocktail de pesticides induisent une mort importante des cellules après seulement 2 jours de traitement et de façon dose-dépendant (Figure 2). Dans les cellules HepaRG, l'analyse de l'expression des gènes confirme une réduction très importante des marqueurs hépatocytaires (CYP2E1/3A4, UGT1A3, aldolase B) confirmant la mort des cellules métaboliquement actives, au profit d'une augmentation de l'expression de Cdk1 et de GPX3, attestant respectivement, d'une prolifération cellulaire et d'un stress oxydant.



**Figure 2 : Toxicité du cocktail de pesticides *in vitro* sur des cellules HepaRG et des hépatocytes humains primaires. Altérations de la morphologie des cellules HepaRG (A) et des hépatocytes humains (B) sous l'effet d'un traitement à différentes doses (¼, ½, 1, 3 & 6 ADI ou Acceptable Daily Intake) du cocktail de pesticides pendant 48 heures. Contenu en ATP des cellules HepaRG (C) et des hépatocytes humains (D) sous l'effet du cocktail des pesticides. E) Expression génique (aldolase B, CYP2E1, CYP3A4, UGT1A3, CDK1, SOD2, CK19, GPX3) dans les cellules HepaRG contrôles ou traitées.**

Afin d'étudier les effets sur l'apparition et/ou l'aggravation de la stéatose, nous devons nous placer à un pourcentage de mort cellulaire très faible pour pouvoir en apprécier les mécanismes cellulaires (tâche 1). Il en est de même pour déterminer le métabolisme et les courbes de biocinétiques (tâche 2). Nous réaliserons donc de nouveaux tests de cytotoxicité aiguë et chronique aux concentrations adaptées des 1<sup>ers</sup> résultats du projet PeNiCA.

### Tâche 1 : Effets des pesticides sur les cellules HepaRG stéatosées et non stéatosées

Dans le projet PESTIFAT, nous allons utiliser le modèle cellulaire HepaRG de NAFL sur 14 jours. Pour répondre au 1<sup>er</sup> objectif du projet, les cellules HepaRG stéatosées ou non seront exposées pendant 14 jours à de faibles doses, individuellement et en mélange de pesticides, afin d'en établir les effets cellulaires sur le contenu en triglycérides, les concentrations d'ATP, la respiration mitochondriale, la formation des ERO et l'expression de différents marqueurs d'inflammation (Figure 3).

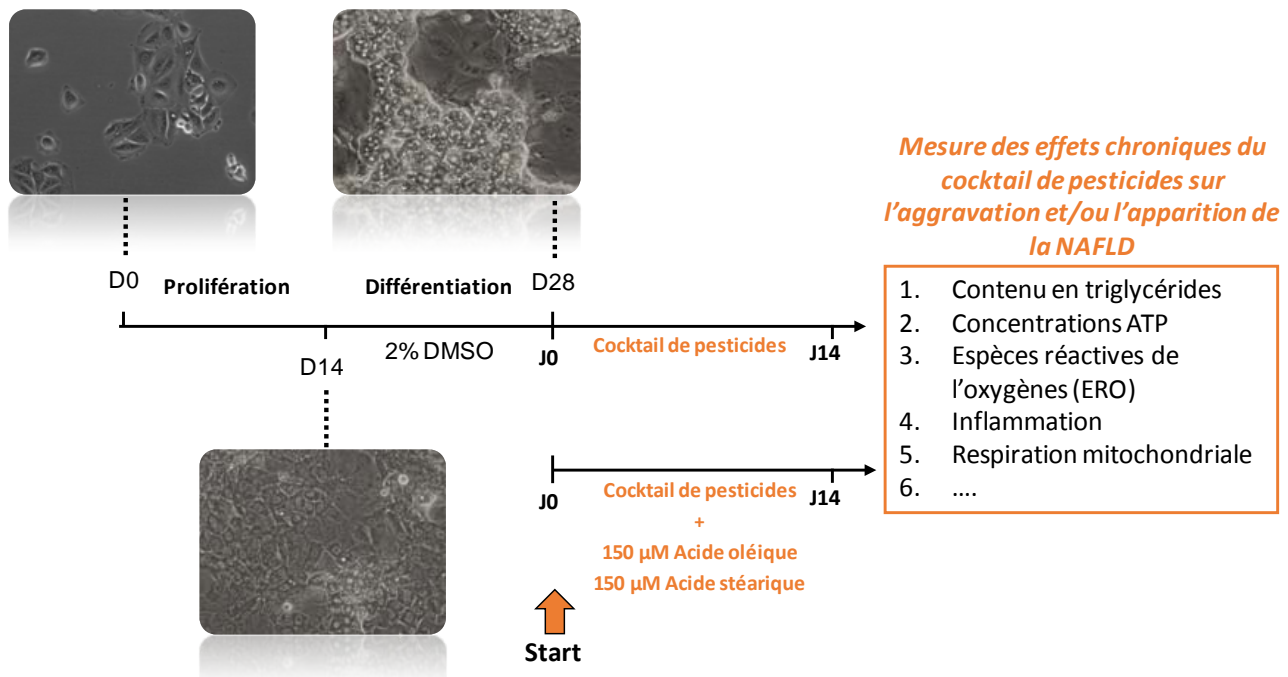


Figure 3 : Plan expérimental de la tâche 1 du projet PESTIFAT. Après un mois de culture pour obtenir des cellules différenciées, les cellules HepaRG seront exposées pendant 14 jours au cocktail de pesticides et/ou au mélange d'acides gras.

L'accumulation des lipides neutres sera évaluée grâce au rouge Nile (sonde fluorescente) et l'utilisation de l'appareil d'imagerie ImageXpress Micro Confocal High-Content Imaging System (Bucher et al., 2018). Les triglycérides intracellulaires seront mesurés grâce à une méthode biochimique classique (kit Biovision). La perte de viabilité des cellules sera évaluée par la mesure de l'ATP intracellulaire (Michaut et al., 2016). La respiration mitochondriale sera étudiée par la mesure de la consommation d'oxygène en présence de L-glutamine/glucose/pyruvate grâce à un appareil Agilent Seahorse XFe24 (Bucher et al., 2018 ; Le Guillou et al., 2018). Cet appareil permet de mesurer sur des cellules adhérentes, différents paramètres de la respiration mitochondriale tels que la respiration basale, la respiration maximale et la fuite de proton (qui est augmentée s'il y a un découplage de la phosphorylation oxydative). La  $\beta$ -oxydation mitochondriale des acides gras sera spécifiquement étudiée grâce à l'utilisation d'une méthode radioactive utilisant de l'acide palmitique marqué au  $^{14}\text{C}$  ([U- $^{14}\text{C}$ ] palmitate) (Anthérieu et al., 2011 ; Bucher et al., 2018). Les ERO seront mesurées grâce à deux sondes fluorescentes, le  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  et le MitoSOX Red<sup>TM</sup> qui permettent de détecter respectivement le peroxyde d'hydrogène cellulaire et l'anion superoxyde mitochondrial (Bucher et al., 2018). L'expression de différentes cytokines pro-inflammatoires (e.g. IL1 $\beta$ , IL6, TNF $\alpha$ ) sera mesurée par RT-qPCR pour les gènes et par ELISA pour les protéines (Aninat et al., 2008).

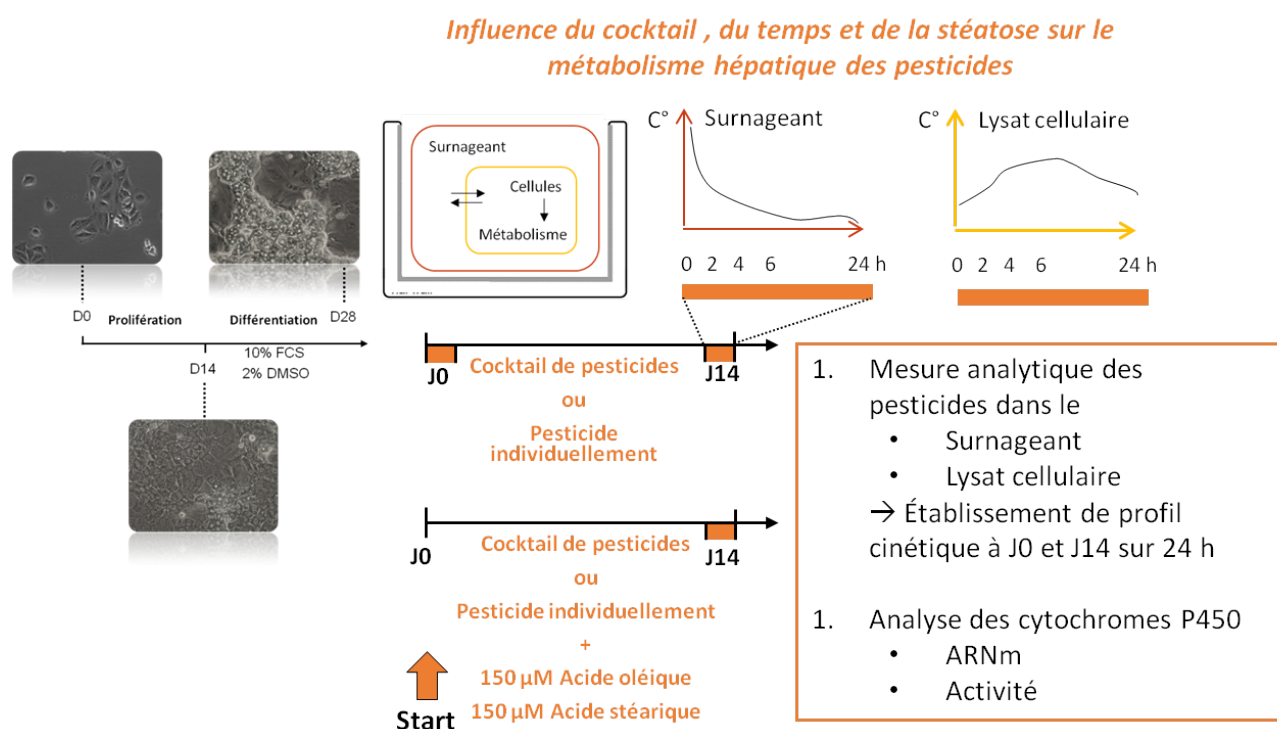
## Tâche 2 : Etude du métabolisme des pesticides

L'exposition à plusieurs pesticides peut faire varier la toxicocinétique de la substance active individuelle, modifiant ainsi la toxicité prédite. Par ailleurs les altérations physiopathologiques hépatiques liées à l'obésité peuvent altérer la toxicocinétique des xénobiotiques et donc modifier également leur toxicité (Kondakala et al., 2017 ; Massart et al., 2017). A ces deux facteurs, s'ajoute la notion d'exposition répétée. Afin d'étudier le métabolisme des pesticides sur notre modèle expérimental, des dosages analytiques auront lieu sur le surnageant et le contenu cellulaire après extraction afin de déterminer des profils de cinétique de disparition du pesticide individuellement et en mélange, à 24 h et après 14 jours d'exposition sur des cellules stéatosées ou non (Figure 4). Pour ce faire, pendant les premières et dernières 24 h d'exposition (Jour 0 et Jour 14), les surnageants et les cellules seront prélevés aux temps 0, 30 min, 1h, 3h et 24h selon un protocole déjà



réalisé au laboratoire (Pomponio et al., 2015 ; Truisi et al., 2015 ; Bellwon et al., 2015 ; Broeders et al., 2015). En mesurant la disparition des substances actives en fonction du temps dans le surnageant, les profils biocinétiques permettront de déterminer l'influence du cocktail et de la stéatose sur le métabolisme. L'analyse du contenu cellulaire permettra de prendre en compte l'accumulation éventuelle des substances actives liée au traitement répété mais qui peut également être liée à l'accumulation de gouttelettes lipidiques (Pomponio et al., 2015).

L'étude de l'expression des CYPs sera faite par RT qPCR et leurs activités correspondantes par le dosage de métabolites spécifiques de substrat des principaux CYPs (CYP3A4, CYP2C9, CYP2E1) (Aninat et al., 2008 ; Savary et al., 2014).



**Figure 4 : Plan expérimental de la tâche 2 du projet PESTIFAT**

Les approches analytiques déployées permettront d'une part de quantifier les concentrations des substances actives et d'autre part de mettre en évidence la présence des métabolites hépatiques voire de les identifier.

En ce qui concerne le suivi des substances actives, le laboratoire (partenaire 3) dispose déjà de méthodes pour 4 des 7 substances actives mais qui nécessitent la mise en œuvre de plusieurs techniques de chromatographie liquide et chromatographie en phase gazeuse couplées à la spectrométrie de masse. De façon à autoriser le traitement d'un grand nombre d'échantillons mais aussi de travailler sur le mélange des 7 substances actives, une méthode unique sera développée. La chromatographie en phase liquide sera privilégiée car elle devrait permettre de regrouper les substances actives en une seule séquence et de mettre en évidence l'apparition de métabolites. La chromatographie en phase gazeuse pourra être conservée en cas de difficulté analytique de certains composés.

Pour la mise en évidence de l'apparition de métabolites, le laboratoire pourra mettre en œuvre plusieurs modes de détection lors de l'analyse des échantillons : la détection par absorption UV qui permet de suivre aisément l'évolution de pics chromatographiques correspondant à des métabolites, la spectrométrie de

masse avec l'acquisition des chromatogrammes en mode « full-scan », et la spectrométrie de masse en mode « tandem » qui permettent d'approcher la masse molaire d'un composé, ou de répondre à des sensibilités basses. Le parc analytique comprend de plus un spectromètre de masse haute résolution (temps de vol), pouvant être couplé à la chromatographie liquide ou gazeuse. Cet équipement devrait permettre d'aller jusqu'à l'identification de la structure des métabolites. Selon l'importance du nombre de métabolites repérés dans les échantillons, cette démarche ne pourra pas être systématiquement appliquée car elle est fastidieuse et coûteuse en temps. Le choix des échantillons et des métabolites sur lesquels les efforts devront être portés sera guidé par les résultats des expérimentations menées *in vitro*.

#### Mesures adoptées pour garantir la confiance sur la qualité des résultats

Les expériences seront réalisées à minima en triplicats biologiques pour garantir des effets statistiquement différents, c'est-à-dire sur au moins trois lots de cellules HepaRG issues de repiquages différents. Chaque expérimentation sera conduite en présence de contrôle positif afin de s'assurer de la qualité des modèles de culture et des résultats. A titre d'exemple, l'amiodarone sera utilisé car ce médicament entraîne une stéatose via une dysfonction mitochondriale dans différents modèles expérimentaux incluant les cellules HepaRG (Fromenty et Pessayre, 1995 ; Anthérieu et al., 2012).

En terme d'analyses quantitatives, les bonnes pratiques d'assurance et de contrôle qualité seront mises en œuvre pour garantir le maintien des performances (vérification de la justesse par des solutions croisées, des taux de récupération et la limite de quantification, injection de blanc matrice, de doubles) et l'identification des composés (respect des critères pour le temps de rétention, pour les ratios entre les ions de quantification et les ions de qualification).

Pour l'identification des métabolites d'intérêt, l'examen de la masse moléculaire du composé, du massif isotopique et des fragments permettra de proposer une structure. Pour vérifier cela, le ou les étalons (isomères par exemple) commercialement disponibles seront injectés afin de pouvoir garantir une identification sans ambiguïté.

## 4. Les partenaires

Le projet PESTIFAT implique des équipes mettant en œuvre des expertises complémentaires : hépatotoxicité (incluant la stéatose), mécanismes de la toxicité hépatique des xénobiotiques, physiopathologie de la NAFL, métabolisme des xénobiotiques et mesure analytique des substances actives dans différentes matrices (biologique et environnementale).

#### *Equipe 1 : U-1241 Inserm - Inra - Université de Rennes 1 Equipe Expres*

Bernard Fromenty, Directeur de recherche  
Anne Corlu, Directeur de recherche  
Claudine Rauch, Assistant Ingénieur Inserm  
Camille Savary Post-doctorant

#### *Equipe 2 : U-1241 Inserm - Inra - Université de Rennes 1 Equipe TGTC*

Pascal Loyer Chargé de recherche  
Catherine Ribault, Assistant Ingénieur Inserm  
Kevin Petitjean, Ingénieur d'étude Inserm

Ces deux équipes de la même unité NEMECAN collaborent étroitement depuis de nombreuses années. Les atouts pour le projet reposent sur :

- La maîtrise des modèles cellulaires hépatiques ;

- La maîtrise de modèles hépatiques de stéatose liée à l'obésité ou à des xénobiotiques ;
- La mise en évidence de l'impact toxicologique et fonctionnel d'une exposition chronique des hépatocytes à différents xénobiotiques (médicaments, pesticides, bisphénol A...);
- L'étude des mécanismes de toxicité hépatique des xénobiotiques (formation de métabolites réactifs, stress oxydant, dysfonction mitochondriale, inflammation)
- La connaissance du métabolisme hépatique des xénobiotiques
- L'expérience de l'étude d'interactions métaboliques au niveau hépatique (effets des mélanges de pesticides)

L'unité « Nutrition, Métabolismes et Cancer » est reconnu internationalement pour étudier comment les déterminants alimentaires, comportementaux, environnementaux et métaboliques ont un impact sur la santé et les maladies chroniques de différents organes cibles tels que le foie, le système digestif et le cerveau. Le projet de l'unité soutient une recherche translationnelle et clinique forte pour accélérer le transfert des avancées de la recherche cognitive pour le bénéfice des individus et des malades. L'unité réunit des experts en sciences sociales et comportementales, neurosciences, nutrition, hépatologie, gastroentérologie, cancérologie, physiologie, métabolisme, toxicologie, microbiologie, biologie moléculaire et cellulaire, et génomique.

Les partenaires de ce projet ont de l'expérience dans la gestion de projets collaboratifs. On peut citer :

- Partenaire du Projet Cancéropôle Grand Ouest (2017) PeNiCa « Effets de pesticides combinés à faibles doses sur les cellules souches/stromales des niches : impact sur la progression, l'aggravation et la chimiorésistance cancéreuses et possibilité de modulation par les antioxydants »
- Coordinateur du contrat ANR (2014-2019) MITOXDRUGS intitulé "Toxicité mitochondriale et hépatotoxicité médicamenteuse. Généralisation de la relation causale pour le développement de nouveaux tests prédictifs".
- Partenaire du contrat ANR (2013-2018) STEATOX "Impacts des agents chimiques environnementaux sur les mécanismes de progression pathologique de la stéatose hépatique"
- Partenaire du projet Européen FP7 PROJECT PredictIV (2008-2012) "Profiling the toxicity of new drugs: a non animal-based approach integrating toxico-dynamics and biokinetics"
- Partenaire du projet Européen FP7-HEALTH-2007-LIV-ES (2008-2012) "Development of culture conditions for the differentiation of hES cells into hepatocytes, WP4 leader: differentiation of hepatic progenitor cells into mature hepatocytes "

### ***Equipe 3 : BRGM / Direction des laboratoires – Unité chimie Environnementale***

Nicole Baran, Dr, responsable de la coordination des activités de recherche de la Direction

Laurence Amalric, Dr, responsable de l'Unité de chimie environnementale

Sébastien Bristeau, IE, chimiste

Techniciens spécialisés dans une approche analytique

L'équipe interviendra dans le cadre du projet sur :

- Le développement et la mise en œuvre d'approches analytiques quantitatives sur différentes matrices (aqueuses et biologiques) pour les 7 substances actives ;
- La mise en évidence de l'apparition et de l'évolution des métabolites au cours des expérimentations ;

- Pour les métabolites d'intérêt (fort effet constaté), la recherche de leur structure voire de leur identification.

Les atouts du BRGM pour ce projet reposent sur la diversité de ses équipements analytiques et de son expertise en chimie analytique.

Le parc analytique du BRGM est composé de divers matériels d'extraction et de préparation des échantillons et d'équipement d'analyses complémentaires. Ainsi le laboratoire dispose de plusieurs systèmes de chromatographie en phase gazeuse ou phase liquide couplés à différents détecteurs (UV-DAD ; MS ; MS/MS). Le laboratoire dispose également d'un spectromètre masse haute résolution quadrupole à haut temps de vol (XEVO G2S QTOF, Waters) permettant d'opérer en mode d'ionisation positif et négatif. En amont un système de séparation de chromatographie en phase liquide (UPLC) peut être utilisé tout comme un système de séparation de chromatographie en phase gazeuse (APGC Atmospheric Pressure Gas Chromatography) permettant d'accéder à une gamme très large de molécules.

Le BRGM est un organisme du laboratoire national de référence AQUAREF (<http://www.aquaref.fr/>) et membre fondateur et actif du réseau européen NORMAN (Network of reference laboratories, research centres and related organisations for monitoring of emerging environmental substances)

Bien que le BRGM intervienne de manière plus fréquente sur des matrices environnementales, ses compétences sont également mises en œuvre dans des projets « santé » impliquant de travailler sur d'autres matrices. A titre d'exemple, le

- projet financé par la Région Centre Val de Loire (APR IR 2017) BEMOL «Bisphenols : occurrence Environnementale, interaction Métabolique et effet sur la gonade femelle », porté par IINRAUMR0085 Physiologie de la Reproduction et des Comportements
- projet ABACHlor Analyse, Bactéries Anaérobies, Chlordécone (AIP DEMICHLORD INRA2010) «Études exploratoires de la dégradation microbienne de la chlordécone».
- projet financé par la Région Centre Val de Loire (APR IR 2011) ToxEmergenCe: détecter la présence et mesurer la concentration de polluants environnementaux émergents dans le réseau hydrologique de la Région Centre et évaluer leur toxicité sur le contrôle cérébral de la Reproduction Humaine en utilisant des modèles biologiques alternatifs à l'expérimentation animale
- projet européen (2002) COMPRENDO "COMParative Reserach on ENDOcrine disrupters : Phylogenetic approach and common principles focusing on androgenetic/antiandrogenetic compounds"

## 5. Organisation du projet

Le projet PESTIFAT sera mené grâce aux compétences de chacune des équipes impliquées dans le projet. Camille Savary, post-doctorante recrutée sur le projet organisera les expériences sur les cellules HepaRG et analysera les résultats. Chaque plan expérimental sera discuté en amont et les résultats analysés en réunion avec Bernard Fromenty, Pascal Loyer et Anne Corlu. Des réunions mensuelles auront pour but de faire le point sur les avancées et les futures expérimentations à réaliser. Une aide technique précieuse sera assurée par Catherine Ribault, Kilian Petitjean et Claudine Rauch.

Chaque personne dans le projet sera capable de remettre en question les résultats s'ils s'avèrent peu concluants et sera à même de proposer d'autres analyses à réaliser afin de déterminer les mécanismes d'action des pesticides en mélange sur la toxicité hépatique.

Pour la partie analytique de la tâche 2, chaque série expérimentale (réplicat biologique) sera envoyée par transporteur dans de bonnes conditions (carboglace). Chaque réplicat biologique sera traité indépendamment. Les échantillons seront pris en charge par la direction des laboratoires du BRGM. Suivant le planning établi en concertation avec les partenaires du projet, les analyses quantitatives seront réalisées. Dans un deuxième temps, la mise en évidence et l'identification des métabolites sera réalisée. En fonction des 1<sup>ers</sup> résultats, la pertinence de réinjecter les échantillons sur un 2<sup>ème</sup> équipement sera évaluée.

Les résultats analytiques pourront être échangés par e-mail et analysés lors de réunion biannuelle sur Rennes ou Orléans.

Les échanges entre les partenaires seront aussi fréquents que nécessaire pour planifier les expérimentations et analyses, préciser les conditions expérimentales (compromis entre la concentration susceptible d'avoir des effets et des concentrations mesurables) et déterminer la liste des métabolites d'intérêt en vue de leur identification.

## 6. Actions de valorisation

Les résultats du projet PESTIFAT seront valorisés par des communications orales et/ou posters lors de congrès nationaux et internationaux de toxicologie, par exemple :

- Rencontres scientifiques de l'Anses - Restitution du Programme national de recherche environnement santé travail (PNREST)
- Congrès annuel de la Société Française de Toxicologie (SFT)
- Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX)

Nous tenterons de publier les résultats originaux dans des revues scientifiques internationales de toxicologie de premier ordre telles que *Environmental Health Perspectives*, *Toxicological Sciences*, *Toxicological Letter...* D'un point de vue analytique, la mise en évidence des métabolites ainsi que leurs identifications autoriseront une valorisation dans des revues à comité de lecture (e.g. *Analytical and Bioanalytical chemistry*).

## 7. Considérations légales et éthiques

Le projet PESTIFAT répond aux exigences éthiques et la règle des 3R puisque les expériences sont réalisées sur un modèle *in vitro* physiologique pertinent concernant l'évaluation des effets chroniques de molécules toxiques (Savary et al., 2015 ; Le Guillou et al., 2018).

## 8. Références

- Al-Eryani, L., Wahlang, B., Falkner, K.C., Guardiola, J.J., Clair, H.B., Prough, R.A., and Cave, M. (2015). Identification of Environmental Chemicals Associated with the Development of Toxicant-associated Fatty Liver Disease in Rodents. *Toxicol Pathol* 43, 482–497.
- Aninat, C., Piton, A., Glaise, D., Le Charpentier, T., Langouët, S., Morel, F., Guguen-Guillouzo, C., and Guillouzo, A. (2006). Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab. Dispos.* 34, 75–83.
- Aninat, C., Seguin, P., Descheemaeker, P.-N., Morel, F., Malledant, Y., and Guillouzo, A. (2008). Catecholamines induce an inflammatory response in human hepatocytes. *Crit. Care Med.* 36, 848–854.
- Anthérieu, S., Rogue, A., Fromenty, B., Guillouzo, A., and Robin, M.-A. (2011). Induction of vesicular steatosis by amiodarone and tetracycline is associated with up-regulation of lipogenic genes in HepaRG cells. *Hepatology* 53, 1895–1905.
- Arab, J.P., Arrese, M., and Trauner, M. (2018). Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu Rev Pathol* 13, 321–350.
- Aubert, J., Begriche, K., Knockaert, L., Robin, M.A., and Fromenty, B. (2011). Increased expression of cytochrome P450 2E1 in nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and pathophysiological role. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 35, 630–637.
- Aubert, J., Begriche, K., Delannoy, M., Morel, I., Pajaud, J., Ribault, C., Lepage, S., McGill, M.R., Lucas-Clerc, C., et al. (2012). Differences in early acetaminophen hepatotoxicity between obese ob/ob and db/db mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 342, 676–687.

- Begriche, K., Massart, J., Robin, M.-A., Borgne-Sanchez, A., and Fromenty, B. (2011). Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *J. Hepatol.* *54*, 773–794.
- Begriche, K., Massart, J., Robin, M.-A., Bonnet, F., and Fromenty, B. (2013). Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* *58*, 1497–1507.
- Bellwon, P., Truisi, G.L., Bois, F.Y., Wilmes, A., Schmidt, T., Savary, C.C., Parmentier, C., Hewitt, P.G., Schmal, O., Josse, R., et al. (2015). Kinetics and dynamics of cyclosporine A in three hepatic cell culture systems. *Toxicol In Vitro* *30*, 62–78.
- Bonnet, F., Gastaldelli, A., Pihan-Le Bars, F., Natali, A., Roussel, R., Petrie, J., Tichet, J., Marre, M., Fromenty, B., Balkau, B., et al. (2017). Gamma-glutamyltransferase, fatty liver index and hepatic insulin resistance are associated with incident hypertension in two longitudinal studies. *J. Hypertens.* *35*, 493–500.
- Broeders, J.J.W., Parmentier, C., Truisi, G.L., Jossé, R., Alexandre, E., Savary, C.C., Hewitt, P.G., Mueller, S.O., Guillouzo, A., Richert, L., et al. (2015). Biokinetics of chlorpromazine in primary rat and human hepatocytes and human HepaRG cells after repeated exposure. *Toxicol In Vitro* *30*, 52–61.
- Bucher, S., Tête, A., Podechard, N., Liamin, M., Le Guillou, D., Chevanne, M., Coulouarn, C., Imran, M., Gallais, I., Fernier, M., Hamdaoui, Q., Robin, M.A., Sergent, O., Fromenty, B., Lagadic-Gossmann, D. Co-exposure to benzo[a]pyrene and ethanol induces a pathological progression of liver steatosis in vitro and in vivo. *Sci Rep* 2018 (en révision).
- Choi, J., Hodgson, E., and Rose, R.L. (2004). Inhibition of trans-permethrin hydrolysis in human liver fractions by chlorpyrifos oxon and carbaryl. *Drug Metabol Drug Interact* *20*, 233–246.
- Cobbina, E., and Akhlaghi, F. (2017). Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) - pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters. *Drug Metab. Rev.* *49*, 197–211.
- Duval, C., Teixeira-Clerc, F., Leblanc, A.F., Touch, S., Emond, C., Guerre-Millo, M., Lotersztajn, S., Barouki, R., Aggerbeck, M., and Coumoul, X. (2017). Chronic Exposure to Low Doses of Dioxin Promotes Liver Fibrosis Development in the C57BL/6J Diet-Induced Obesity Mouse Model. *Environ. Health Perspect.* *125*, 428–436.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2017. The 2015 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA Journal* 2017;15(4):4791, 134 pp. doi:10.2903/j.efsa.2017.4791
- Feng, Z., Sun, X., Yang, J., Hao, D., Du, L., Wang, H., Xu, W., Zhao, X., and Sun, C. (2012). Metabonomics analysis of urine and plasma from rats given long-term and low-dose dimethoate by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Chem. Biol. Interact.* *199*, 143–153.
- Fromenty, B. (2013). Drug-induced liver injury in obesity. *J. Hepatol.* *58*, 824–826.
- Fromenty, B., and Pessayre, D. (1995). Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol. Ther.* *67*, 101–154.
- Fromenty, B., Berson, A., and Pessayre, D. (1997). Microvesicular steatosis and steatohepatitis: role of mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. *J. Hepatol.* *26 Suppl 1*, 13–22.
- García-Ruiz, I., Rodríguez-Juan, C., Díaz-Sanjuan, T., del Hoyo, P., Colina, F., Muñoz-Yagüe, T., and Solís-Herruzo, J.A. (2006). Uric acid and anti-TNF antibody improve mitochondrial dysfunction in ob/ob mice. *Hepatology* *44*, 581–591.
- Han, E., and Lee, Y.H. (2017). Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: The Emerging Burden in Cardiometabolic and Renal Diseases. *Diabetes Metab J* *41*, 430–437.
- Hart, C.L., Morrison, D.S., Batty, G.D., Mitchell, R.J., and Davey Smith, G. (2010). Effect of body mass index and alcohol consumption on liver disease: analysis of data from two prospective cohort studies. *BMJ* *340*, c1240.
- Heindel, J.J., Blumberg, B., Cave, M., Machtinger, R., Mantovani, A., Mendez, M.A., Nadal, A., Palanza, P., Panzica, G., Sargis, R., et al. (2017). Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. *Reprod. Toxicol.* *68*, 3–33.
- Heise, T., Schmidt, F., Knebel, C., Rieke, S., Haider, W., Geburek, I., Niemann, L., and Marx-Stoelting, P. (2018). Hepatotoxic combination effects of three azole fungicides in a broad dose range. *Arch. Toxicol.* *92*, 859–872.
- Hochane, M., Trichet, V., Pecqueur, C., Avril, P., Oliver, L., Denis, J., Brion, R., Amiaud, J., Pineau, A., Naveilhan, P., et al. (2017). Low-Dose Pesticide Mixture Induces Senescence in Normal Mesenchymal Stem Cells (MSC) and Promotes Tumorigenic Phenotype in Premalignant MSC. *Stem Cells* *35*, 800–811.
- Hodgson, E and Rose, R.L. (2007). Human metabolic interactions of environmental chemicals. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* *21*, 182–186.
- Jin, C., Luo, T., Fu, Z., and Jin, Y. (2018). Chronic exposure of mice to low doses of imazalil induces hepatotoxicity at the physiological, biochemical, and transcriptomic levels. *Environ. Toxicol.* doi: 10.1002/tox.22550.
- Jossé, R., Aninat, C., Glaire, D., Dumont, J., Fessard, V., Morel, F., Poul, J.-M., Guguen-Guillouzo, C., and Guillouzo, A. (2008). Long-term functional stability of human HepaRG hepatocytes and use for chronic toxicity and genotoxicity studies. *Drug Metab. Dispos.* *36*, 1111–1118.
- Kondakala, S., Lee, J.H., Ross, M.K., and Howell, G.E. (2017). Effects of acute exposure to chlorpyrifos on cholinergic and non-cholinergic targets in normal and high-fat fed male C57BL/6J mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *337*, 67–75.
- Labbe, G., Pessayre, D., and Fromenty, B. (2008). Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies. *Fundam Clin Pharmacol* *22*, 335–353.
- Ledda, C., Loreto, C., Zammit, C., Marconi, A., Fago, L., Matera, S., Costanzo, V., Fuccio Sanzà, G., Palmucci, S., Ferrante, M., et al. (2017). Non-infective occupational risk factors for hepatocellular carcinoma: A review (Review). *Mol Med Rep* *15*, 511–533.
- Le Guillou, D., Bucher, S., Begriche, K., Hoët, D., Lombès, A., Labbe, G., Fromenty, B. Drug-induced alterations of mitochondrial DNA homeostasis in steatotic and non-steatotic HepaRG cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2018 (en révision)
- Mahli, A., and Hellerbrand, C. (2016). Alcohol and obesity: A dangerous association for fatty liver disease. *Dig Dis* *34 Suppl 1*, 32–39.
- Mahli, A., Thasler, W.E., Patsenker, E., Müller, S., Stickel, F., Müller, M., Seitz, H.K., Cederbaum, A.I., and Hellerbrand, C. (2015). Identification of cytochrome CYP2E1 as critical mediator of synergistic effects of alcohol and cellular lipid accumulation in hepatocytes in vitro. *Oncotarget* *6*, 41464–41478.

- Mailloux, R.J., Florian, M., Chen, Q., Yan, J., Petrov, I., Coughlan, M.C., Laziyan, M., Caldwell, D., Lalande, M., Patry, D., et al. (2014). Exposure to a northern contaminant mixture (NCM) alters hepatic energy and lipid metabolism exacerbating hepatic steatosis in obese JCR rats. *PLoS ONE* 9, e106832.
- Massart, J., Begriche, K., Moreau, C., and Fromenty, B. (2017). Role of nonalcoholic fatty liver disease as risk factor for drug-induced hepatotoxicity. *J Clin Transl Res* 3, 212–232.
- Michaut, A., Moreau, C., Robin, M.-A., and Fromenty, B. (2014). Acetaminophen-induced liver injury in obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 34, e171-179.
- Michaut, A., Le Guillou, D., Moreau, C., Bucher, S., McGill, M.R., Martinais, S., Gicquel, T., Morel, I., Robin, M.-A., Jaeschke, H., et al. (2016). A cellular model to study drug-induced liver injury in nonalcoholic fatty liver disease: Application to acetaminophen. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 292, 40–55.
- Mitchell, C., Robin, M.A., Mayeuf, A., Mahrouf-Yorgov, M., Mansouri, A., Hamard, M., Couton, D., Fromenty, B., and Gilgenkrantz, H. (2009). Protection against hepatocyte mitochondrial dysfunction delays fibrosis progression in mice. *Am. J. Pathol.* 175, 1929–1937.
- Mulligan, C., Kondakala, S., Yang, E.-J., Stokes, J.V., Stewart, J.A., Kaplan, B.L.F., and Howell, G.E. (2017). Exposure to an environmentally relevant mixture of organochlorine compounds and polychlorinated biphenyls Promotes hepatic steatosis in male Ob/Ob mice. *Environ. Toxicol.* 32, 1399–1411.
- Mutch, E., and Williams, F.M. (2006). Diazinon, chlorpyrifos and parathion are metabolised by multiple cytochromes P450 in human liver. *Toxicology* 224, 22–32.
- Peris-Sampedro, F., Blanco, J., Cabré, M., Basaure, P., Guardia-Escote, L., Domingo, J.L., Sánchez, D.J., and Colomina, M.T. (2018). New mechanistic insights on the metabolic-disruptor role of chlorpyrifos in apoE mice: a focus on insulin- and leptin-signalling pathways. *Arch. Toxicol.* doi: 10.1007/s00204-018-2174-3.
- Pirozzi, A.V.A., Stellavato, A., La Gatta, A., Lamberti, M., and Schiraldi, C. (2016). Mancozeb, a fungicide routinely used in agriculture, worsens nonalcoholic fatty liver disease in the human HepG2 cell model. *Toxicol. Lett.* 249, 1–4.
- Pomponio, G., Savary, C.C., Parmentier, C., Bois, F., Guillouzo, A., Romanelli, L., Richert, L., Di Consiglio, E., and Testai, E. (2015). In vitro kinetics of amiodarone and its major metabolite in two human liver cell models after acute and repeated treatments. *Toxicol In Vitro* 30, 36–51.
- Reffstrup, T.K., Larsen, J.C., and Meyer, O. (2010). Risk assessment of mixtures of pesticides. Current approaches and future strategies. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 56, 174–192.
- RÈGLEMENT (CE) NO 396/2005 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 23 février 2005 concernant les limites maximales applicables aux résidus de pesticides présents dans ou sur les denrées alimentaires et les aliments pour animaux d'origine végétale et animale et modifiant la directive 91/414/CEE du Conseil.
- Satapati, S., Kucejova, B., Duarte, J.A.G., Fletcher, J.A., Reynolds, L., Sunny, N.E., He, T., Nair, L.A., Livingston, K.A., Livingston, K., et al. (2015). Mitochondrial metabolism mediates oxidative stress and inflammation in fatty liver. *J. Clin. Invest.* 125, 4447–4462.
- Savary, C.C., Jossé, R., Bruyère, A., Guillet, F., Robin, M.-A., and Guillouzo, A. (2014). Interactions of endosulfan and methoxychlor involving CYP3A4 and CYP2B6 in human HepaRG cells. *Drug Metab. Dispos.* 42, 1235–1240.
- Savary, C.C., Jiang, X., Aubry, M., Jossé, R., Kopp-Schneider, A., Hewitt, P., and Guillouzo, A. (2015). Transcriptomic analysis of untreated and drug-treated differentiated HepaRG cells over a 2-week period. *Toxicol In Vitro* 30, 27–35.
- Shi, X., Wahlang, B., Wei, X., Yin, X., Falkner, K.C., Prough, R.A., Kim, S.H., Mueller, E.G., McClain, C.J., Cave, M., et al. (2012). Metabolomic analysis of the effects of polychlorinated biphenyls in nonalcoholic fatty liver disease. *J. Proteome Res.* 11, 3805–3815.
- Spaggiari, D., Daali, Y., and Rudaz, S. (2016). An extensive cocktail approach for rapid risk assessment of in vitro CYP450 direct reversible inhibition by xenobiotic exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 302, 41–51.
- Stellavato, A., Lamberti, M., Pirozzi, A.V.A., de Novellis, F., and Schiraldi, C. (2016). Myclobutanil worsens nonalcoholic fatty liver disease: An in vitro study of toxicity and apoptosis on HepG2 cells. *Toxicol. Lett.* 262, 100–104.
- Tang, J., Cao, Y., Rose, R.L., and Hodgson, E. (2002). In vitro metabolism of carbaryl by human cytochrome P450 and its inhibition by chlorpyrifos. *Chem. Biol. Interact.* 141, 229–241.
- Tanner, N., Kubik, L., Luckert, C., Thomas, M., Hofmann, U., Zanger, U.M., Böhmert, L., Lampen, A., and Braeuning, A. (2018). Regulation of Drug Metabolism by the Interplay of Inflammatory Signaling, Steatosis, and Xeno-Sensing Receptors in HepaRG Cells. *Drug Metab Dispos* 46, 326–335.
- Truisi, G.L., Consiglio, E.D., Parmentier, C., Savary, C.C., Pomponio, G., Bois, F., Lauer, B., Jossé, R., Hewitt, P.G., Mueller, S.O., et al. (2015). Understanding the biokinetics of ibuprofen after single and repeated treatments in rat and human in vitro liver cell systems. *Toxicol. Lett.* 233, 172–186.
- Wahlang, B., Beier, J.I., Clair, H.B., Bellis-Jones, H.J., Falkner, K.C., McClain, C.J., and Cave, M.C. (2013). Toxicant-associated steatohepatitis. *Toxicol Pathol* 41, 343–360.
- Wahlang, B., Song, M., Beier, J.I., Cameron Falkner, K., Al-Eryani, L., Clair, H.B., Prough, R.A., Osborne, T.S., Malarkey, D.E., Christopher States, J., et al. (2014). Evaluation of Aroclor 1260 exposure in a mouse model of diet-induced obesity and non-alcoholic fatty liver disease. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 279, 380–390.
- Washington, T., and Tchounwou, P.B. (2004). Cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma (HepG2) cells exposed to iprodione. *Int J Environ Res Public Health* 1, 12–20.
- Yang, J., Cao, J., Sun, X., Feng, Z., Hao, D., Zhao, X., and Sun, C. (2012). Effects of long-term exposure to low levels of organophosphorous pesticides and their mixture on altered antioxidative defense mechanisms and lipid peroxidation in rat liver. *Cell Biochemistry and Function* 30, 122–128.
- Yokoyama, Y., Sasaki, Y., Terasaki, N., Kawataki, T., Takekawa, K., Iwase, Y., Shimizu, T., Sanoh, S., and Ohta, S. (2018). Comparison of drug metabolism and its related hepatotoxic effects in HepaRG, cryopreserved human hepatocytes, and HepG2 cell cultures. *Biol. Pharm. Bull.* doi: 10.1248/bpb.b17-00913.