

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
MOUNA TLILI

EFFETS DE L'ENTRAÎNEMENT SUR LE CATABOLISME DES LIPIDES
HÉPATIQUES CHEZ DES RATS EXPOSÉS AU BPC126

AOÛT 2017

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier la Dre Carole Lavoie pour m'avoir si chaleureusement accueillie dans son laboratoire pour mon stage et m'a offerte par la suite l'opportunité de continuer à la maîtrise afin de mener des recherches aussi importantes qu'intéressantes. Un merci tout spécial à mon directeur, le Dr Marc Germain de m'avoir permis de m'ouvrir et m'impliquer dans différents domaines et d'avoir fait de moi une scientifique autonome et débrouillarde, des qualités qui s'avéreront indispensables pour la suite de ma carrière dans le domaine de la recherche scientifique. Ainsi qu'à la Dre Natalie-Ann Chapados de l'Université d'Ottawa d'avoir réalisé le protocole expérimental, sans elle ce projet n'aurait pas pu être possible.

Je souhaite aussi remercier Marie-Pier St-Onge et Valérie Majeau qui ont réalisé leur stage de 3^e année en biologie médicale dans notre laboratoire que j'ai pu encadrer de près ou de loin tout au long de ma maîtrise. Elles m'ont permis d'approfondir plus mes connaissances et de développer le sens de la pédagogie.

RÉSUMÉ

Les biphenyles polychlorés (BPCs) sont des polluants organiques persistants qui ont été utilisés principalement dans l'industrie électrique et comme isolants. Leur commercialisation fut interrompue depuis des décennies, mais ils demeurent encore présents dans l'environnement en raison de leur résistance à la dégradation.

Une exposition aux BPCs a récemment été associée à des troubles endocriniens et métaboliques. Plus spécifiquement, la présence de BPCs dans l'organisme semble induire une stéatose hépatique non alcoolique (SHNA), soit une accumulation de lipides dans le foie. Les stratégies présentement employées dans le traitement de la SHNA incluent l'entraînement. Étonnamment, les effets de l'entraînement sur la SHNA chez les organismes exposés aux BPC n'ont pas été étudiés. Nous avons donc investigué l'effet de l'entraînement sur les mécanismes intra-hépatiques reliés à la SHNA provoqués par l'effet des BPCs possiblement altérés chez les rats. Parmi ces mécanismes, on retrouve majoritairement les acides gras qui sont la majeure source d'énergie provenant de la voie de la β -oxydation mitochondriale. Les acides gras libres proviennent de la dégradation du contenu des gouttelettes lipidiques par des enzymes lysosomales, par un mécanisme appelé lipophagie. Par ceci, nous voulons donc identifier les mécanismes impliqués dans les effets anti-toxiques potentiels de l'entraînement dans le développement de la SHNA lors d'une exposition au BPC. Les rats ont été divisés aléatoirement en quatre groupes : contrôle sédentaire, BPC126 sédentaire, contrôle entraînement et BPC126 entraînement. Les animaux ont été soumis à un entraînement à la nage de trois semaines. La quantification des vésicules lipidiques a montré une augmentation de leur nombre chez les rats sédentaires traités au BPC126. Cette augmentation est corrélée par l'augmentation de l'expression de la protéine FABP1 impliquée dans le métabolisme des lipides. Par contre, chez les rats traités BPC126 et entraînés, une augmentation du nombre et une diminution de l'aire des vésicules ont été observées. Ce rétrécissement de l'aire peut être supporté par l'augmentation de l'expression des protéines mitochondrielles, mitHSP70 et PGC1 α . Cette dernière est une protéine nécessaire à la biogenèse mitochondriale ainsi qu'une augmentation de l'expression des protéines peroxysomales (PMP70 et Pex19). L'analyse de l'enzyme lysosomale montre une altération de l'activité enzymatique suite au traitement au BPC126 et à l'entraînement de trois semaines.

En somme, ces observations suggèrent que l'entraînement atténuerait les effets du BPC126 sur la SHNA en favorisant la diminution des lipides par la β -oxydation.

Mots-clés : BPC126, SHNA, entraînement, lipides β -oxydation, lysosomes, peroxysomes, mitochondries.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ.....	iii
LISTE DES FIGURES ET TABLEAU.....	vi
LISTE DES ABREVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	vii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Toxicité des BPCs.....	6
1.1.1 Effets de la toxicité des dioxines (TCDD) et « dioxin-like » (BPCs).....	8
1.2 Les troubles métaboliques	8
1.2.1 Effets des BPCs sur le métabolisme du stress oxydatif	9
1.2.2 Effet des BPCs sur le métabolisme glucidique.....	10
1.2.3 Effets des BPCs sur le métabolisme lipidique	12
1.2.4 Effet du BPC sur la stéatose hépatique non-alcoolique (SHNA)	15
1.3 Mode d'action des BPCs	20
1.3.1 Détoxification des BPCs.....	21
1.3.2 Modes d'actions des CYPs	22
1.4 Effets de l'entraînement sur le métabolisme	25
1.4.1 Effets de l'entraînement sur la SHNA	27
1.5 Hypothèse	30
1.5.1 Objectifs et résultats.....	34
CHAPITRE II	
MATÉRIEL ET MÉTHODES	35
2.1 Animaux et protocole expérimental.....	35
2.2 Procédures expérimentales	36
2.2.1 Anticorps et réactifs	36
2.2.2 Coloration à l'oil Red O (ORO)	36
2.2.3 Immunobuvardage de type Western (WB)	37
2.2.4 Mesure de l'activité de la lipase acide lysosomale (LAL).....	37
2.2.5 Analyses statistiques	38

CHAPITRE III	
RÉSULTATS.....	39
3.1 L'entraînement réduit la taille des vésicules lipidiques chez les rats exposés au BPC126.....	39
3.2 L'exposition au BPC126 diminue l'activité lysosomale mais pas l'autophagie	41
3.3 L'entraînement prévient l'accumulation de lipides dans le foie en augmentant la β -oxydation	44
CHAPITRE IV	
DISCUSSION	48
CHAPITRE V	
CONCLUSION.....	58
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	60

LISTE DES FIGURES ET TABLEAU

Figure		Page
1.1 Sources de contamination par les dioxines	3	
1.2 Répartition des dioxines dans les aliments	4	
1.3 Structure du BPC	5	
1.4 Effet du TCDD sur les différentes enzymes lipidiques	14	
1.5 Augmentation accrue des lipides alimentaires dans la stéatose hépatique provoquée par la TCDD	14	
1.6 Schéma résumant les différents effets du BPCs sur le métabolisme glucidique et lipidique	15	
1.7 Coloration intracellulaire à l'Oil Red O des vésicules lipidiques dans des cellules HepG2	19	
1.8 Schéma illustrant l'effet des BPCs sur le développement de la SHNA	20	
1.9 Mécanisme d'action de récepteur aryl hydrocarbone (AHR)	21	
1.10 Système de contrôle des xénobiotiques	25	
1.11 Résumé de l'effet de l'exercice physique sur la SHNA	29	
1.12 Dégradation des lipides par lipophagie	32	
1.13 Schéma résumant les étapes de la β -oxydation	33	
1.14 Illustration des protéines impliquées dans la lipophagie	34	
3.1 L'entraînement diminue la taille des vésicules lipidiques accumulées suite au BPC126	41	
3.2 L'entraînement et le BPC126 altèrent l'activité lysosomale	43	
3.3 L'entraînement améliore la biogénèse mitochondriale et peroxisomale	46	
4.1 Schéma synthétisant l'effet du BPC126 sur les hépatocytes	8	
4.2 Schéma du mécanisme potentiel impliqué dans l'atténuation des lipides suite à l'entraînement	9	

Tableau

1.1 Facteur équivalent toxique (TEF)	7
--	---

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

POP	Polluant organique persistant
BPC	Biphényl polycholoré
ROS	Reactive Oxygen Species
Nrf2	Nuclear Factor (erythroid-derived 2)-Like 2
Keap1	Kelch-like ECH-associated Protein 1
HIF-1 α	Hypoxia Inducible Factor 1-alpha
Zn-SOD	Zinc superoxyde dismutase
GPx	Glutathione peroxydase
PEPCK-C	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
TG	Triglycéride
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
SHNA	Stéatose hépatique non alcoolique
ALT	Alanine aminotransférase
AG	Acide gras
AHR	Aryl Hydrocarbon Receptor
VLDL	Very Low Density Lipid
IHTG	Intra Hepatic Triglyceride
FABP1	Fatty Binding Protein 1
LAL	Lysosomal Acid Lipase
Pex19	Peroxisomal Biogenesis Factor 19
PMP70	Peroxisomal Membrane Protein 70-kDa
P62	Nucleoporin p62
PGC1 α	Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma Coactivator 1-alpha

LC3	Microtubule-associated Protein1 Light Chain 3
mtHSP70	Mitochondrial Heat Shock Protein 70
kg	Kilogramme
kDa	Kilo Dalton
μ M	Micromolaire
β	Bêta
α	Alpha
δ	Gamma

CHAPITRE I

INTRODUCTION

La présence des polluants organiques persistants (POPs) dans l'environnement ne cesse de représenter une menace pour la santé et pour l'environnement à l'échelle planétaire. Étant donné que les POPs peuvent se bio-accumuler et s'introduire dans la chaîne alimentaire, les préoccupations actuelles se concentrent autour de leur impact sur les espèces prédatrices supérieures (Hyotylainen *et al.* 2004, Bergamaschi *et al.* 2005, Wang *et al.* 2014). Comme leur nom l'indique, ils sont qualifiés de persistants en vue de leur demi-vie très longue, qui s'étende à des années ou des décennies dans le sol et les sédiments et à plusieurs jours dans l'atmosphère (Blais *et al.* 2003). Les POPs se divisent en pesticides comme l'Aldrin, le DDT, l'Endrin, en produits chimiques industriels tels que l'hexabromocyclododécane (HBCD), les biphenyles polychlorés (PCB) et hexabromobiphényle et en produits d'événements tels que le dibenzo-p-dioxins polychlorés (PCDD), le pentachlorobenzene, hexachlorobenzene (HCB) provenant des feux de forêt et, dans une moindre mesure, des éruptions volcaniques (Jones *et al.* 1999, Abeliovich *et al.* 2000, Riget *et al.* 2016). Cette inquiétude à l'égard des POPs résulte de leur pouvoir toxique ainsi que de leur grande stabilité (Mori *et al.* 2017). En effet, ces polluants ont été associés à plusieurs effets néfastes chez les mammifères. Parmi ces effets, se trouvent notamment des effets immunotoxiques, des effets cutanés, des altérations de la fonction de reproduction et des effets cancérogènes (L. Ritter 1995, Heilier *et al.* 2005, Aggoun 2007). De plus, les POPs se caractérisent par une résistance aux dégradations photolytiques, biologiques et chimiques. Ainsi, les POPs demeurent longtemps dans l'environnement avant d'être décomposés en d'autres substances moins dangereuses (Merino *et al.* 2007). De plus, ils se démarquent par leur semi-volatilité, une propriété physico-chimique qui leur permet d'exister sous forme de vapeur ou d'être adsorbée sur des particules dans l'atmosphère, ce qui facilite leur transport sur de longues distances avant de se déposer. Les POPs ont tendance à voyager des zones chaudes vers les zones froides et se concentrent dans les climats plus froids, comme le

nord du Canada, ainsi que dans le bassin des Grands Lacs et le fleuve Saint-Laurent (Carrier *et al.* 2006).

Les POPs ont donc l'habileté de se déplacer dans l'atmosphère, ce qui leur confère la capacité d'atterrir soit dans des bassins d'eau, des prairies, des forêts ou des champs des agriculteurs. En se déposant dans tous ces endroits, les POPs s'introduisent dans la chaîne alimentaire. Effectivement, quand un être vivant consomme des aliments qui ont été contaminés par les POPs, le polluant n'est ni éliminé, métabolisé ou détruit, mais s'accumule dans l'organisme. Ce processus est appelé la bioaccumulation (Verhaert *et al.* 2017). Les POPs se distinguent par une lipophilie élevée et par conséquent s'accumulent particulièrement dans les tissus riches en lipides (Schecter *et al.* 2001, Fattore *et al.* 2006). Les POPs dont le représentant le plus connu est la famille des dioxines sont des molécules complexes qui, contrairement aux autres polluants atmosphériques, ne sont pas définies à partir de leur nature chimique, mais à partir des quatre propriétés citées plus haut : la toxicité, la persistance dans l'environnement, la bio-accumulation et le transport sur de longues distances (Weber *et al.* 2008, Kruger *et al.* 2012). Ce sont des composés chimiques toxiques, qui partagent la même structure et le même mécanisme d'action toxique (White *et al.* 2009, Nakatani *et al.* 2017). Les dioxines comprennent deux familles principales: les polychlorodibenzo-para-dioxins (PCDDs) et les polychlorodibenzofurans (PCDFs). Ce sont deux familles de composés distincts, bien que très semblables au point de vue de leur structure moléculaire et de leurs propriétés physico-chimiques. Les dioxines sont des composés aromatiques polycycliques oxygénés, la structure de PCDD a deux atomes d'oxygène, tandis que le PCDF n'en a qu'un (Pirard *et al.* 2002).

Les sources de contamination par les dioxines ont été déterminées par l'agence de protection environnementale (APE). En effet, cinq sources majeures responsables de la contamination environnementale par les dioxines ont été identifiées: la combustion, la fusion, la transformation et l'affinage des métaux, la fabrication de produits chimiques, les processus naturels, et les réservoirs tels que le sol ou les sédiments (Rysavy *et al.* 2013). Un exemple de contamination par les dioxines est illustré dans la Figure 1.1.

De plus, l'alimentation semblerait être la voie principale de contamination, particulièrement à travers les poissons en première position, puis les crustacés, la viande, le lait et autres produits laitiers (Figure 1.2) (Schecter *et al.* 2001).

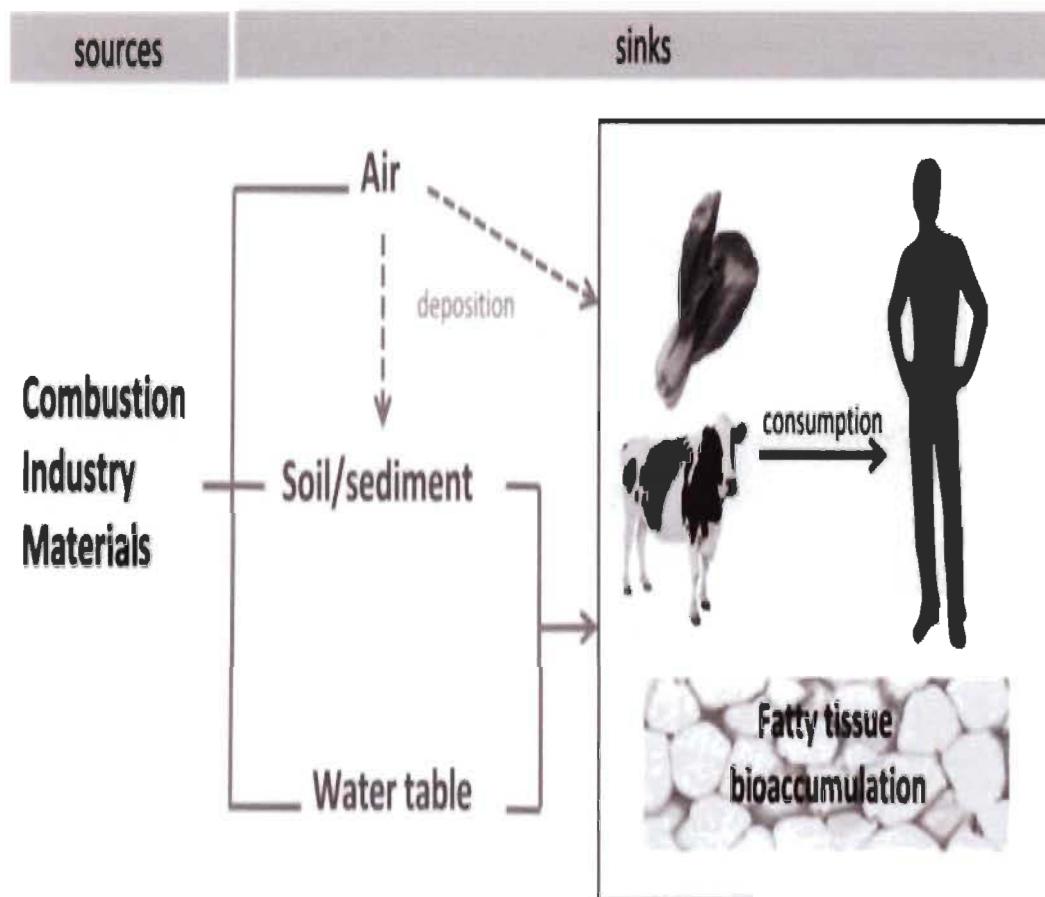


Figure 1.1 Sources de contamination par les dioxines (Rysavy *et al.* 2013).

Les dioxines sont libérées dans l'air comme un produit de divers processus industriels et s'accumulent sur les plantes environnantes et entrent dans le sol et dans l'eau. Par la suite, les gens sont exposés aux dioxines par la consommation de produits d'origine commerciale. En particulier, les aliments à forte teneur en matières grasses sont des filières importantes d'introduction de la dioxine, et chez les humains comme chez les autres animaux.

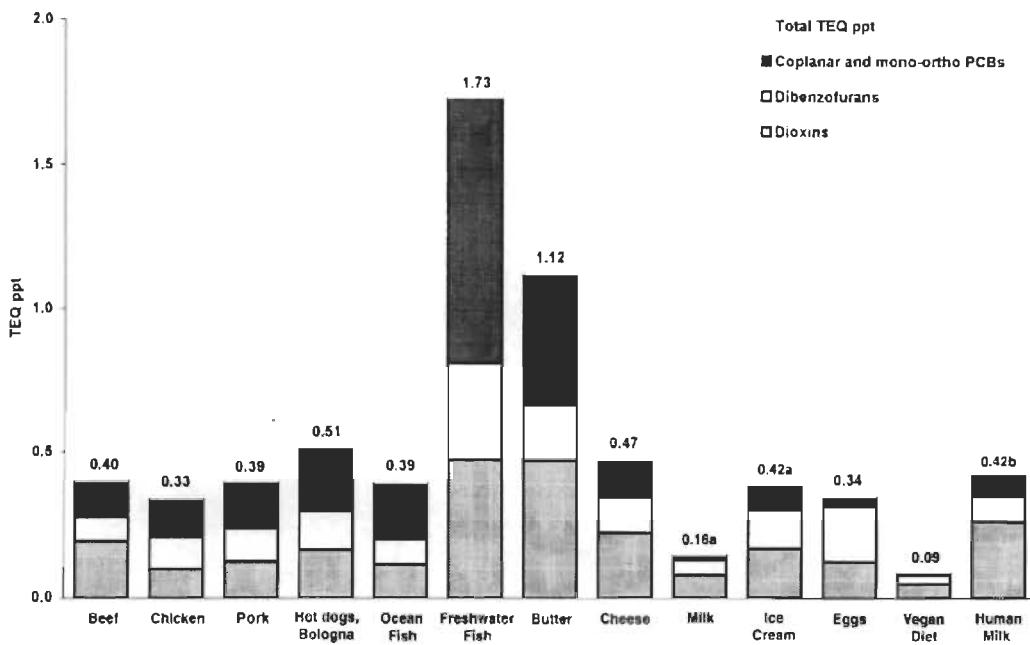


Figure 1.2 Répartition des dioxines dans les aliments (Schecter *et al.* 2001).

Les poissons d'eau douce semblent contenir le plus de dioxines suivies du beurre, des viandes, des volailles et des produits laitiers et végétaux.

TEQ : c'est le Toxic Equivalent de dioxines, calculé par rapport à la forme de dioxine la plus toxique le 2, 3, 7,8-TCDD.

PPT : part /trillion ou picogramme/gramme.

Les processus naturels comme les incendies de forêt ou les incinérations de produits issus des industries aboutissent à la production de contaminants comme les biphenyles polychlorés (BPCs). Ces BPCs ont été catégorisés comme appartenant à la famille des « dioxin-like » (Van den Berg *et al.* 2006). Cette famille inclut 12 types de biphenyles polychlorés (BPC81, BPC77, BPC126, BPC169, BPC105, BPC114, BPC 118, BPC 123, BPC156, BPC157, BPC167, BPC 189). Les deux premiers chiffres réfèrent au nombre d'atomes de carbones et le dernier chiffre correspond au pourcentage d'atomes de chlore (Van den Berg *et al.* 1998). La classification des « dioxin-like » s'est basée sur une structure chimique et un mécanisme d'action toxique communs avec la classe des dioxines. Les BPCs sont composés de deux anneaux benzéniques attachés par une liaison carbone-carbone entre le carbone 1 du premier anneau et le carbone 1 du deuxième anneau avec des atomes de chlore en diverses positions (Barbalace 2003) (Figure 1.3).

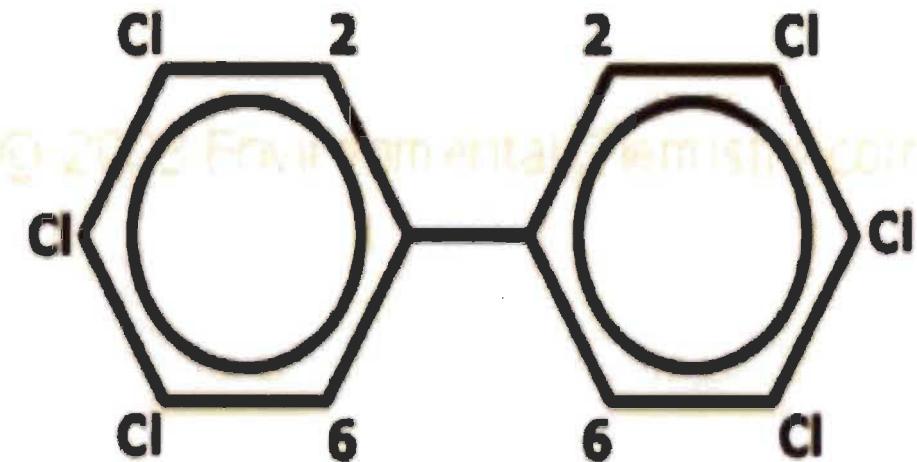


Figure 1.3 Structure du BPC (Barbalace 2003).

Les BPCs ont été synthétisés en Amérique du Nord pour la première fois en 1929. Ils ont été longtemps utilisés comme ingrédients dans de nombreux matériaux industriels, notamment les produits de calfeutrage et d'étanchéité, les huiles de coupe, les encres et les additifs pour la peinture. Ils entraient également dans la composition d'agents réfrigérants et lubrifiants pour certains types de dispositifs électriques, comme les transformateurs et les condensateurs. L'inquiétude sur les risques potentiels associés aux BPCs s'est manifestée pour la première fois en 1966 lorsque la présence de ces polluants a été détectée dans les Grands Lacs (Santé Canada, 2005). De ce fait, l'importation, la fabrication et la vente des BPCs ont été interdites au Canada depuis 1977. En outre, le rejet des BPCs est devenu illégal en 1985. Malgré toutes ces mesures mises en œuvre, les risques liés aux BPCs demeurent présents, étant donné que la législation canadienne a permis aux propriétaires de BPCs de continuer à les utiliser jusqu'à la fin de leur durée de vie utile. Le stockage des BPCs est réglementé depuis 1988. La manutention, le transport et la destruction des BPCs sont également réglementés, principalement en vertu des réglementations provinciales. Par conséquent, les stocks de BPCs ont significativement diminué, mais cela n'empêche pas que les risques de contamination sont encore relativement élevés, suite aux incidents de déversements dans le milieu et lors d'incendies. En effet, la contamination aux hydrocarbures aromatiques polychlorés de type BPCs peut se produire par le rejet sous forme liquide qui peut contaminer le sol ou l'eau à proximité, ou encore lors

d'incendies, la température élevée pouvant transformer les BPCs liquides en aérosol. Par conséquent, les BPCs peuvent être inhalés ou transportés par les courants atmosphériques (Institut national de santé publique du Québec, 2006).

Le risque d'exposition aux BPCs demeure fortement présent faute d'adopter des mesures afin d'accélérer l'élimination progressive des BPCs. Effectivement, Environnement Canada craint que l'objectif de l'élimination des BPCs au Canada ne soit pas atteint avant une autre décennie. On ne prévoit l'élimination totale des BPCs du territoire qu'en 2025 (Environnement et Changement climatique Canada, 2014). Malgré l'interdiction de l'utilisation des BPCs au Canada et les mesures mises en œuvre pour leur élimination, les risques liés à la contamination demeurent présent du fait qu'ils se démarquent par leur grande stabilité chimique, ayant la capacité de résister à l'oxydation par les acides, les bases ou les autres agents chimiques, ce qui les rend ainsi peu biodégradables (Institut national de santé publique du Québec, 2006) et donc persistants dans l'environnement (Santé Canada, 2016).

1.1 Toxicité des BPCs

Les BPCs ont la même structure chimique et un mode d'action similaire que le prototype chimique de la classe des dioxines, le 2, 3, 7, 8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) (Mandal 2005). Par conséquent, la toxicité est déterminée en facteur d'équivalent toxique par rapport à la toxicité du TCDD. Par ailleurs, comme expliqué précédemment, les BPCs sont des structures polychlorées, de ce fait, la toxicité des BPCs varie selon la localisation et le nombre d'atomes de chlore dans la structure. Le BPC126 est reconnu comme le plus toxique dans sa catégorie de par son nombre élevé d'atomes de chlore, mais aussi par son facteur d'équivalent toxique (TEF) élevé (Nice-Sophia Antipolis, 2004) (Tableau 1.1).

Tableau 1.1
Facteur équivalent toxique (TEF)

Dioxine	TEF
TCDD (2, 3, 7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine)	1
BPC	TEF
BPC 81 (3,4,4',5-Tétrachlorobiphényle)	0.0003
BPC 126 (3,3',4,4',5 Pentachlorobiphényle)	0.1
BPC 169 (3,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphényle)	0.03
BPC 105 (2,3,3',4,4'-Pentachlorobiphényle)	0.00003
BPC 114 (2,3,4,4',5-Pentachlorobiphényle)	0.00003
BPC 118 (2,3',4,4',5-Pentachlorobiphényle)	0.00003
BPC 123 (2,3',4,4',5'-Pentachlorobiphényle)	0.00003
BPC 156 (2,3,3',4,4',5-Hexachlorobiphényle)	0.00003
BPC 157 (2,3,3',4,4',5'-Hexachlorobiphényle)	0.00003
BPC 167 (2,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphényle)	0.00003
BPC189 (2,3,3',4,4',5,5'-Heptachlorobiphényle)	0.00003
BPC 77 (3,3',4,4' Tétrachlorobiphényle)	0.0001

Tableau adapté d'EPA (United States Environmental Protection Agency)
www.epa.gov/pcbs/table-polychlorinated-biphenyl-pcb-congeners

1.1.1 Effets de la toxicité des dioxines (TCDD) et « dioxin-like » (BPCs)

L'exposition aux POPs a été liée à de nombreux troubles au niveau des différents systèmes. Plusieurs cas de pathologies hépatiques comme des adénomes et carcinomes hépatocellulaires, des cholangiocarcinomes (une tumeur développée à partir de l'épithélium tapissant les voies biliaires), de l'hépatotoxicité, et des maladies chroniques du foie ont été rapportées chez des populations exposées au TCDD et aux BPCs de façon accidentelle ou sur le lieu de travail (Yoshizawa *et al.* 2007, Du *et al.* 2016). De même, au niveau du système endocrinien, le taux de cancer pancréatique a augmenté chez des gens travaillant dans les usines de fabrication de transformateurs au Canada. De plus, des cas d'hypothyroïdie ont été enregistrés chez des femmes, hommes et enfants exposés aux dioxines (Kohn 2000, Nault *et al.* 2017). Les investigations chez les murins ont montré des changements dans la fonction, la structure et la taille du foie. Ces altérations hépatiques engendrent notamment, une cytotoxicité hépatique, une augmentation de la quantité de lipides dans le foie et une hypertrophie et une nécrose hépatique (Kohn 2000, Nault *et al.* 2017). Afin d'élucider les mécanismes de toxicité provoqués par les BPCs, les études menées à cette fin ont pris le BPC126 comme modèle considérant son potentiel toxique élevé (Yoshizawa *et al.* 2007). Les altérations sur les métabolismes du stress oxydatif, glucidique et lipidique engendrées par le BPC126 seront détaillées dans les sections suivantes.

1.2 Les troubles métaboliques

Les pathologies métaboliques sont définies comme une perturbation du fonctionnement normal du métabolisme (Hazarika *et al.* 2016). L'importance du bon fonctionnement métabolique se caractérise par la conversion de la nourriture en énergie au niveau cellulaire. Pour ce fait, des milliers d'enzymes œuvrent dans différentes voies métaboliques pour le bon maintien de ce processus (Kumar *et al.* 2013). Les troubles métaboliques affectent la capacité de la cellule d'effectuer correctement les réactions biochimiques impliquées dans le transport d'acides aminés, glucides ou lipides (Botchlett *et al.* 2017). Les troubles métaboliques surviennent suite à certains facteurs

comme l'obésité, la dyslipidémie qui se caractérise par une concentration trop élevée d'un ou plusieurs lipides (le cholestérol et les triglycérides) présents dans le sang ou encore le diabète (Aggoun 2007). Mais aussi, les polluants environnementaux peuvent engendrer une perturbation du métabolisme (Wu *et al.* 2017).

1.2.1 Effets des BPCs sur le métabolisme du stress oxydatif

Les organismes multicellulaires réagissent aux changements métaboliques normaux en répondant via des facteurs de croissance et d'hormones qui favorisent la croissance et le maintien de l'organisme. De même, ils répondent aux stress exogènes comme les molécules chimiques, xénobiotiques, la chaleur et la radiation, à travers de nombreuses voies de signalisations spécifiques (Simmons *et al.* 2009). Notamment, l'exposition aux BPCs est considérée comme un stress exogène pouvant altérer les mécanismes de défense cellulaire (Artacho-Cordon *et al.* 2016, Wang *et al.* 2017, Wu *et al.* 2017). En effet, une exposition au BPC126 entraîne une augmentation du stress oxydatif et une perturbation du potentiel redox hépatique (Lai *et al.* 2010). Cette perturbation est due à la diminution de protéines antioxydantes. Particulièrement, le BPC126 induit une diminution du taux de Zinc, un cofacteur pour la production de protéines antioxydantes dans le foie, ce qui influence la production d'enzymes antioxydantes comme la Zn-supéroxyde dismutase (Zn-SOD) (Twaroski *et al.* 2001). En effet, la Zn-SOD est la première ligne de défense contre le stress oxydatif et permet d'éliminer l'anion supéroxyde formée à partir de l'oxygène (Simmons *et al.* 2009). De plus, une exposition au BPC126 engendre une diminution du taux de l'enzyme glutathione peroxydase (GPx) hépatique qui élimine les peroxydes lipidiques résultant de l'effet du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés (Muller *et al.* 2002, Lai *et al.* 2010). De plus, l'exposition aux polluants environnementaux tel que le BPC126 engendre une diminution du taux de la protéine antioxydante le glutathionne (GSH) hépatique mais sans diminuer le taux de GSSH la forme oxydée du GSH, ce qui débalance le ratio GSH/GSSH (Twaroski *et al.* 2001). En outre, l'exposition au BPC126 affecte le taux de sélénium en le modulant négativement. Le sélénium est un métal considéré comme protecteur et une composante importante de certains enzymes comme

la GPx (Keating *et al.* 2012). Une autre étude a démontré qu'une injection de BPC126 à des rats réduisait le niveau hépatique de la forme oxydée et réduite de la glutathione de 20 % chez les rats traités comparés au niveau des contrôles, augmentant le stress oxydatif. De plus, le BPC126 a un impact important sur les métaux hépatiques, causant une diminution de 30% du niveau de sélénium hépatique et une réduction du taux de zinc de 15 %. En effet, une diminution du SeGPx hépatique de 60 % corrobore la diminution du taux du sélénium.(Lai *et al.* 2010). Il est aussi important de mentionner que la réponse centrale au stress est le stress oxydatif, qui est généré suite à plusieurs polluants environnementaux, ainsi qu'à des réactions cellulaires capables de produire des entités d'oxygènes réactifs (ROS) (Abeliovich *et al.* 2000). En somme, toutes ces perturbations des taux de ces enzymes antioxydantes ont pour conséquence d'augmenter le stress oxydatif et donc la production de ROS.

1.2.2 Effet des BPCs sur le métabolisme glucidique

Les BPCs ont été identifiés comme des facteurs perturbant le métabolisme. En effet, il a été démontré qu'une dose faible et chronique de BPCs cause une altération du métabolisme glucidique (Remillard *et al.* 2002) allant jusqu'à induire le diabète de type 2 (Longnecker *et al.* 2001, Grice *et al.* 2017). L'exposition au BPC126 engendre à court terme une résistance à l'insuline qui se caractérise par une élévation du taux circulant de l'insuline qui est sécrétée pour maintenir la glycémie (Lee *et al.* 2006). En effet, il a été montré que l'activation du récepteur spécifique aux dioxines l'hydrocarbone aryl (AHR) influence l'activité de facteurs nucléaires, dans le contexte du métabolisme du glucose, tels que les récepteurs nucléaires PPARs (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) (Alexander *et al.* 1998). Ces récepteurs nucléaires sont responsables de l'homéostasie glucidique ainsi que de la transcription du transporteur du glucose, GLUT4 exprimé sur les adipocytes et les muscles squelettiques (Zaarour *et al.* 2012). L'activation de la voie de signalisation de l'insuline augmente la densité de GLUT4 à la surface membranaire et conséquemment augmente l'absorption du glucose (Bergqvist *et al.* 2017). De plus, des études épidémiologiques ont montré

l'augmentation de la prévalence du diabète chez des sujets exposés aux POPs (Remillard *et al.* 2002).

À long terme, le BPC126 induit l'inflammation du pancréas, ce qui aboutit à une altération du fonctionnement du pancréas, les cellules responsables de la sécrétion de l'insuline. Cette altération induit une défaillance voir une dégradation des cellules β du pancréas (Nyska *et al.* 2004). La conséquence de ces effets est le diabète de type2 qui se définit par une résistance à l'insuline ainsi qu'un dysfonctionnement des cellules β du pancréas (Loiola *et al.* 2016). En outre, une étude a montré *in vivo* que l'exposition BPC126 induit une résistance à l'insuline et un état pré-diabétique (Loiola *et al.* 2016).

Les études menées *in vivo* et *in vitro* ont donc démontré la capacité du BPC126 à engendrer une résistance à l'insuline et est par conséquent un facteur important pour le développement du diabète. Or mis le fait qu'il affecte le rôle de l'insuline, il module aussi la production du glucose. En effet, le BPC126 perturbe le maintien de la glycémie en provoquant une altération de la gluconéogenèse. Effectivement, l'exposition au BPC126 diminue la transcription de l'enzyme limitante de la gluconéogenèse la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK-C) (Gadupudi *et al.* 2016).

PEPCK-C catalyse la conversion de l'oxaloacetate (OAA), un intermédiaire du cycle de Krebs, en phosphoénolpyruvate (PEP), pour être converti à son tour en glucose et exporté à l'extérieur du foie (Xiong *et al.* 2011). De plus, le BPC126 affecte la glycogénolyse qui est un mécanisme de production de glucose en dégradant le glycogène stocké dans le foie. De ce fait, une exposition au BPC126 diminue le taux de l'enzyme glycogène phosphorylase qui catalyse la conversion du glycogène stocké dans le foie en glucose-6-phosphate (Gadupudi *et al.* 2016). En somme, le BPC126 altère le maintien de la glycémie en diminuant la production hépatique de glucose, la gluconéogenèse et la glycogénolyse, mais il interfère aussi avec le transport du glucose en diminuant le taux du transporteur bidirectionnel du glucose entre le foie et le sang (GLUT2). (Thorens 1996, Gadupudi *et al.* 2016) (Figure 1.7).

1.2.3 Effets des BPCs sur le métabolisme lipidique

Tout comme le métabolisme glucidique, les BPCs affectent aussi le métabolisme lipidique. Il a été rapporté qu'une injection de BPCs altère le mécanisme lipidique en affectant la dégradation ainsi que la sécrétion de triglycérides (TGs) (Chapados *et al.* 2017). Il est donc évident qu'une exposition aux BPCs mène à des changements lipidiques dans le plasma et les tissus provoqués par leurs interactions avec les lipides et spécialement avec les acides gras (AGs) (Hennig *et al.* 2005). De plus, la rétention du BPC dans les tissus gras est liée au degré de chlorination et de la position des atomes de chlores dans l'anneau biphenyle (Nguyen *et al.* 2008).

Une étude a montré qu'une exposition aux BPCs modifie les acides gras dans les tissus adipeux en diminuant les acides gras insaturés et augmentant les acides gras mono-insaturés dans les membranes phospholipides (Kakela *et al.* 1999). De même qu'elle engendre une augmentation de lipides et de TGs dans le foie. De ce fait, l'exposition aux BPCs déclenche une altération du métabolisme lipidique hépatique, étant donné que le foie à un rôle clé dans le contrôle de la synthèse des acides gras et la circulation des lipides via des lipoprotéines (Nguyen *et al.* 2008).

Non seulement une exposition aux BPCs engendre l'accumulation de lipides, mais aussi altère leur dégradation, en affectant la β -oxydation. La β -oxydation est un mécanisme central nécessaire à la conversion des TGs en énergie par la dégradation des AGs. Ce processus se déroule dans les mitochondries et les peroxysomes. L'effet du BPC sur la biogénèse du peroxysome a été établi en déterminant que les BPCs causent une diminution de PPAR α , une enzyme responsable de la prolifération des peroxysomes ainsi qu'une diminution de deux enzymes, la catalase et l'acyl-CoA Oxidase, qui sont toutes deux localisées dans la membrane du peroxysome, ce qui permet une accumulation des lipides (Robertson *et al.* 2007).

Pour conclure, l'exposition aux BPCs altère le métabolisme lipidique en favorisant l'accumulation de lipides dans les tissus riches en gras, en plus de bloquer leur mécanisme de dégradation. Afin d'expliquer les mécanismes d'action des POPs qui

perturbent le métabolisme lipidique, des études ont pris comme modèle le TCDD et ont montré l'impact sur le métabolisme des acides gras dans le foie (Pohjanvirta *et al.* 1990, Lakshman *et al.* 1991, Angrish *et al.* 2012). En effet, les AGs rentrent aux hépatocytes via des récepteurs de surface cellulaires CD36 (Fatty Acid Translocase) (Drover *et al.* 2005) et sont par la suite soit oxydés dans les mitochondries/peroxysomes ou réestérifiés en TGs pour leur stockage et ensuite secrétés sous forme de VLDL (Very Low Density Lipoprotein) dans le sang ou utilisés par les tissus périphériques. Le traitement de souris wild type (WT) au TCDD a montré une augmentation de la lipase adipeuse prédominante (ATGL) impliquée dans la mobilisation des AGs et une diminution de la masse de lipides, ainsi qu'un blocage de la sécrétion de VLDL. Cependant, ces effets sont CD36 dépendants, effectivement, ils sont renversés chez des souris knock out (KO) en CD36. En outre, chez les souris KO CD36 la stéatose hépatique est bloquée et la diminution du taux plasmatique des TGs est abolie (Lee *et al.* 2010). D'autant plus qu'il a été montré que le TCDD augmentait l'expression de gènes hépatiques associés avec le transport, le traitement et le métabolisme des lipides comme Ldlr, CD36, et Slc27. (Atshaves *et al.* 2010). Le TCDD induit aussi une augmentation de l'expression d'enzymes hydrolysant les lipoprotéines intracellulaires pour augmenter le taux d'AGs interne (Lpl, Mgll, Pnliprpl et Clps). De même, le TCDD augmente l'expression des gènes Mogat1/2 et Dgat1/2, facilitant la biosynthèse des TGs à partir d'AGs. Par la suite, les TGs sont stockés dans des vésicules lipidiques ou incorporés dans les VLDLs. Cependant le TCDD inhibe la sécrétion des VLDL, ce qui augmente les TGs hépatiques et la vacuolisation. D'un autre côté le TCDD inhibe l'oxydation des AGs en inhibant le transport aux mitochondries en inhibant l'expression de gènes requis pour le transport à travers la matrice mitochondriale (Acsm1-4 et Ascl1). Le TCDD réprime aussi l'ATP-citrate lyase (Acly), qui convertie le citrate en acetyl-CoA. L'acétyl CoA est critique pour la synthèse d'AGs via l'enzyme Fasn qui est réprimé par le TCDD, TCDF et PCB126 (Kopec *et al.* 2011, Angrish *et al.* 2012). Ces étapes sont illustrées dans les figures 1.4, 1.5 et 1.6.

Enzymes	Effet du TCDD	Rôles
ATGL	↑	Mobilisation des AGs
CD36	↑	Transport des AGs
Lpl, MgII, Pnliprpr1 et Clps	↑	Hydrolyse des lipoprotéines internes
Mogat1/2 et Dgat1/2	↑	Biosynthèse des AGs
Acsml-4 et Ascl1	↓	Oxydation des AGs

Figure 1.4 Effet du TCDD sur les différentes enzymes lipidiques.

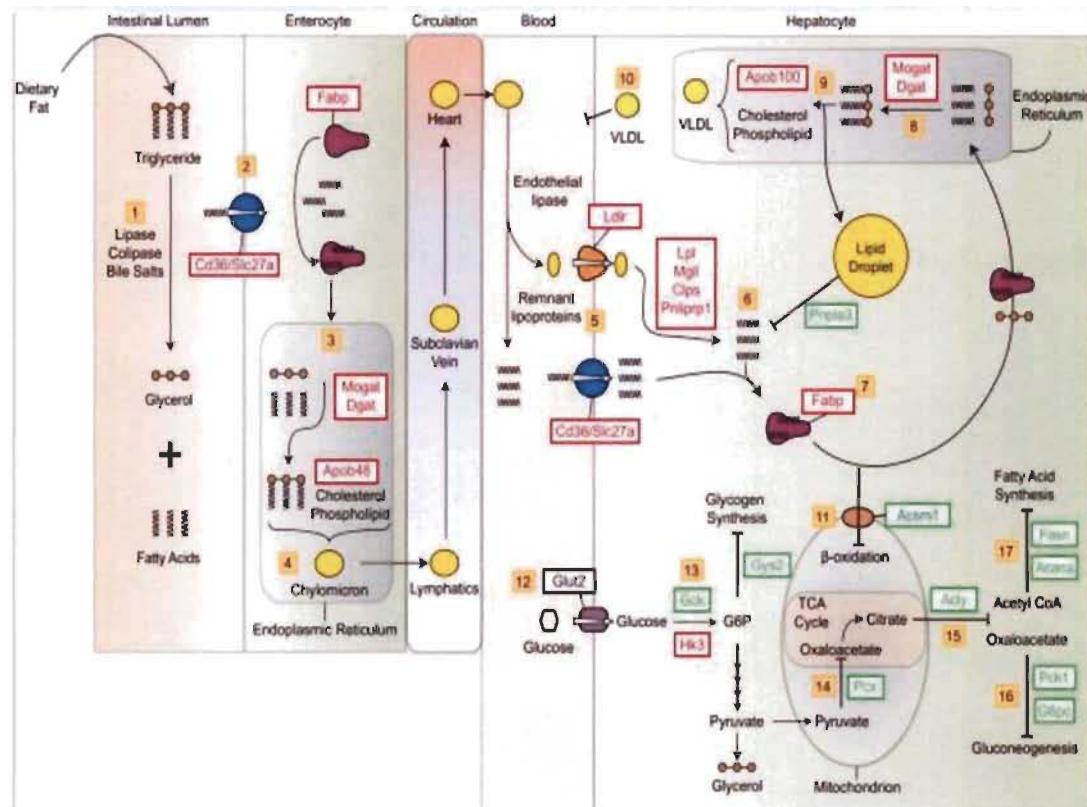


Figure 1.5 Augmentation accrue des lipides alimentaires dans la stéatose hépatique provoquée par la TCDD (Angrish *et al.* 2012).

Étapes 1-4 : absorption des lipides par l'épithélium intestinal et exportation vers le système circulatoire. Étapes 5-11 : Amélioration de l'absorption et du stockage des acides gras hépatiques et inhibition des

voies de dégradation médiées par la β -oxydation. Étapes 12-17 : le métabolisme du glucose hépatique, y compris la synthèse du glycogène, la gluconéogenèse et la synthèse des acides gras sont inhibés. Les carrés rouges indiquent l'expression génique induite. Les carrés verts indiquent l'expression du gène réprimé.

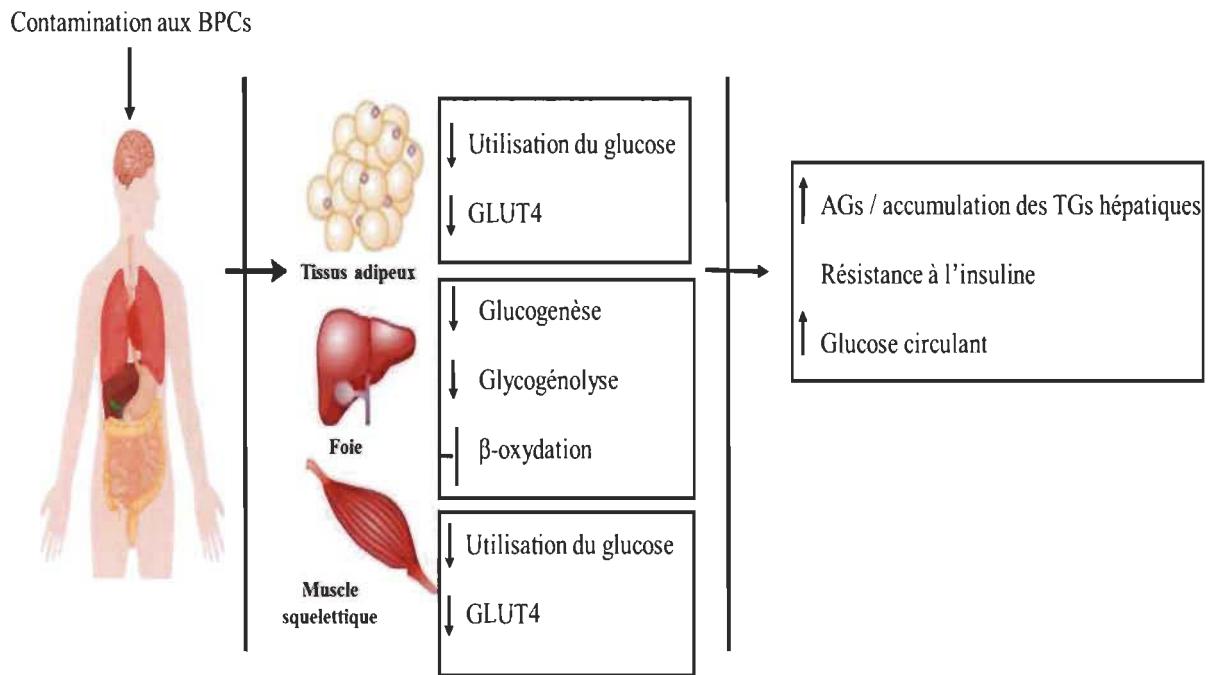


Figure 1.6 Schéma résumant les différents effets du BPCs sur le métabolisme glucidique et lipidique.

L'exposition aux BPCs induit une accumulation des TGs hépatiques, une résistance à l'insuline ainsi qu'une augmentation du taux de glucose circulant, ce qui mène à un état diabétique. Ces observations sont les résultats de différentes altérations sur le tissu adipeux, le foie et le muscle squelettique.

Tissus adipeux et muscles squelettiques : diminution de la transcription des transporteurs de glucose GLUT4 ainsi que de l'utilisation du glucose.

Foie : diminution de la glycogenèse et glycogénolyse et altération du mécanisme de dégradation de lipides, la β -oxydation.

1.2.4 Effet du BPC sur la stéatose hépatique non-alcoolique (SHNA)

Les BPCs altèrent le métabolisme lipidique et bloquent notamment les mécanismes de dégradation des AGs, ce qui mène à une accumulation de lipides hépatiques, comme détaillé ci-dessus. L'accumulation de lipides peut engendrer la

stéatose hépatique non-alcoolique (SHNA). La SHNA est une pathologie qui se définit comme étant une réponse inflammatoire à l'accumulation de lipides dans le foie et qui peut dévier, dans les cas extrêmes, en une cirrhose (Imajo *et al.* 2013, Vizuete *et al.* 2017) (Figure 1.7). L'origine de la stéatose hépatique non-alcoolique (SHNA) est peu connue, mais des facteurs pré-disposants ont été déterminés comme l'obésité, le diabète de type 2, une résistance à l'insuline, une hyperlipidémie et des facteurs génétique pré-disposants (Takaki *et al.* 2013, Aleksandrova *et al.* 2016).

Au niveau métabolique, cette accumulation de lipides est le résultat d'un débalancement entre la synthèse d'AGs et son utilisation. En effet, les AGs sont dégradés en majorité par oxydation dans les mitochondries. Une altération de la voie de dégradation des lipides mène à leur accumulation. Dans les cas d'une stéatose hépatique non-alcoolique, une altération mitochondriale est observée tant au niveau ultra-structural (l'ultrastructure est une structure fine observable au microscope électronique) qu'au niveau fonctionnel incluant l'activité de la chaîne respiratoire et la β -oxydation (Mehta *et al.* 2016). En outre, il est particulièrement important de noter que les mitochondries jouent un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie des lipides via la β -oxydation des AGs qui est initiée par leur conjugaison à un CoA formant l'acyl-CoA. L'acyl-CoA est transféré aux mitochondries par la carnitine palmitoyl transferase I (CPT1). Dans la matrice mitochondriale l'Acétyl-CoA sera dégradé dans le cycle de Krebs en CO₂ pour générer du NADH, FADH₂, du succinate et du GTP. Et finalement, la chaîne respiratoire va oxyder le succinate et NADH et produire de l'ATP (Grattagliano *et al.* 2012). Il a été démontré que l'expression de la CPT1 est inhibée dans les cas de SHNA, ce qui bloque le transfert de l'acyl-CoA aux mitochondries, ce qui par conséquent altère la β -oxydation (Kohjima *et al.* 2007, Berlanga *et al.* 2014). Donc un blocage ou une altération de la β -oxydation et de la chaîne respiratoire mitochondriale mènent à une accumulation de lipides dans le cytosol. Ces lipides vont être peroxydés par les ROS formés par les intermédiaires de la chaîne de transport d'électrons qui réagissent avec l'oxygène pour former les anions superoxydes (Paradies *et al.* 2014, Liu *et al.* 2015). La peroxydation des lipides cause la mort cellulaire et provoque l'inflammation via la sécrétion de cytokines TGF β et TNF α . D'ailleurs, des études menées sur des patients souffrant de

SHNA ont montré que l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale diminue dans les tissus hépatiques (Pessayre *et al.* 1999, Perez-Carreras *et al.* 2003). De plus, un changement au niveau morphologique des mitochondries a été observé, les mitochondries dans le cas de la SHNA deviennent larges, gonflées avec une apparition d'inclusions paracristallines paraissent dans la matrice mitochondriale ainsi qu'une hypodensité. Ces altérations mènent à une diminution de l'activité des complexes impliqués dans les chaînes respiratoires (Perez-Carreras *et al.* 2003, Tilg *et al.* 2016).

Le dysfonctionnement des mitochondries dans les cas de SHNA engendre une accumulation des lipides hépatiques due à l'incapacité de les dégrader par la β -oxydation ainsi qu'une augmentation de la production ROS (Reactive Oxygen Species) (Paradies, Paradies *et al.* 2014). Cependant, une augmentation de la β -oxydation peroxysomale a été observée chez des cas de SHNA (Reddy *et al.* 2001, Macdonald *et al.* 2004), ce qui peut prédire que la voie des peroxysomes compenserait le déficit de la β -oxydation mitochondriale. En effet, les peroxysomes jouent un rôle dans le déroulement de la β -oxydation mitochondriale. Il a été démontré qu'en l'absence du marqueur peroxysomal hépatique (PPAR α), la transcription de l'enzyme CPT-1 est diminuée (Brandt *et al.* 1998). CPT-1 permet aux AGs de traverser la membrane mitochondriale interne pour être métabolisé dans la matrice mitochondriale. La présente diminution notée par Brandt *et al* aurait pour conséquence l'accumulation de lipides sous forme de triglycérides. Par ailleurs, une diète riche en lipides induit une accumulation de TGs dans le foie, une diminution de PPAR α , par contre une augmentation de l'expression de PPAR δ (Souza-Mello 2015). PPAR δ est lié à la lipogenèse, car il induit la transcription de SREBP1-C, une protéine responsable de la synthèse de l'acide gras et inhibe la CPT 1 et par conséquent prévient le transport de l'AG vers les mitochondries pour qu'ils soient métabolisés par la β -oxydation (Souza-Mello *et al.* 2010). Toutes ces observations sont des critères contribuant à la SHNA.

Plusieurs études ont lié une exposition aux composés chimiques industriels au développement de la SHNA (Wahlang *et al.* 2014, Rantakokko *et al.* 2015). Due à l'hydrophobicité des BPCs, le foie et les tissus adipeux sont les principales cibles pour la

toxicité répertoriée par les BPCs (Cave *et al.* 2010) En effet, des études menées chez des animaux et des humains ont non seulement montré que les BPCs sont séquestrés dans le foie(Diliberto *et al.* 1997, Watanabe *et al.* 2013), mais aussi une seule forte dose orale de BPCs augmente le dépôt des TGs dans le foie (Kohli *et al.* 1979). En outre, des études menées par le programme de toxicologie nationale (PTN) ont montré une augmentation du taux de BPCs de 10 fois dans le foie et de 200 fois dans les tissus adipeux chez des rats gavés pendant 2ans (National Toxicology 2006). Une étude épidémiologique a montré que l'exposition aux BPCs provoque des troubles métaboliques associés à la SHNA comme la résistance à l'insuline, l'obésité et le diabète (Cave *et al.* 2010) De plus, il a été montré que l'exposition aux composés chimiques industriels induit une augmentation de l'enzyme alanine aminotransférase (ALT), un biomarqueur des troubles hépatiques présent dans les cas de SHNA et ceci en absence de facteurs viraux, ou de pathologies hépatiques(Cave *et al.* 2010, Rantakokko *et al.* 2015). Les BPCs engendrent également une inflammation hépatique qui fait partie des symptômes associés à la SHNA.(Lai *et al.* 2012). L'inflammation hépatique a été décelée par l'augmentation des taux des cytokines inflammatoire (IL -6 et TNF α). L'accumulation de lipides dans le foie demeure parmi les caractéristiques de la SHNA provoquée par une altération de la dégradation des AGs. Effectivement, une exposition aux BPCs est associée à une altération des voies d'élimination des lipides. En effet, les BPCs induisent une diminution de la production et sécrétion des VLDLs par lesquels les TGs sont transportés et une augmentation de la synthèse de lipides en diminuant la β -oxydation en agissant sur l'activité des enzymes impliqués dans le transport de l'AG aux mitochondries (Lee 2010, Kopec *et al.* 2011). De plus qu'une altération des gènes impliqués dans le métabolisme des AGs comme une augmentation de l'enzyme FAS (Fatty Acid Synthase), responsable de la synthèse des AGs et une diminution de la CPT1 ont été observé chez des rats gavés aux BPCs (Wahlang *et al.* 2014).

L'exposition aux BPCs a été donc déterminée comme un facteur prédisposant à la SHNA, de par son effet réducteur sur l'activité de la β -oxydation, ce qui engendre une accumulation de TGs hépatiques, mais aussi de par son effet inducteur d'inflammation hépatique. De plus, les BPCs engendrent des troubles métaboliques associés à la SHNA

(résistance à l'insuline, diabète,). Ces altérations sont connues pour être impliquées dans le développement de la SHNA. L'effet des BPCs sur le développement de la SHNA est synthétisé dans la figure 1.8.

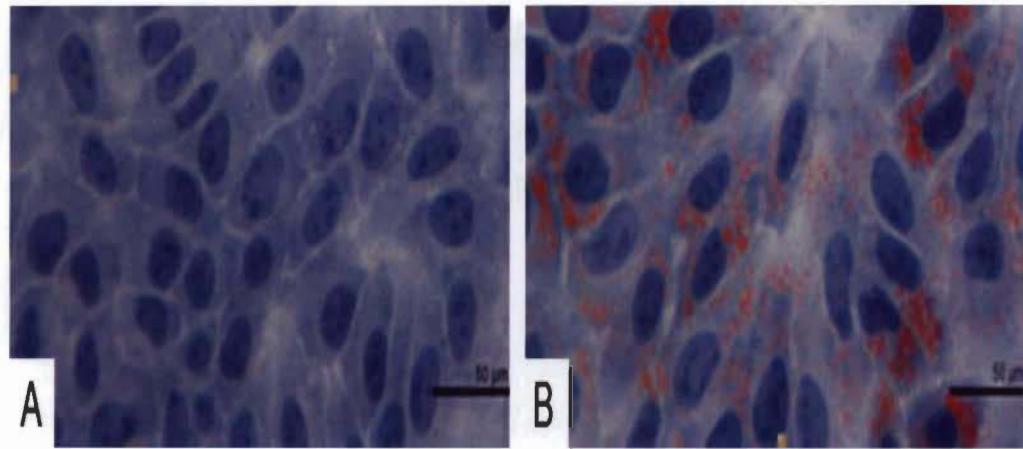


Figure 1.7 Coloration intracellulaire à l'Oil Red O des vésicules lipidiques dans des cellules HepG2 (Zhu *et al.* 2014).

- (A) Absence de vésicules lipidiques chez les cellules normales
- (B) Apparition d'accumulation lipidique chez des cellules stéatosées (lipides en rouge).

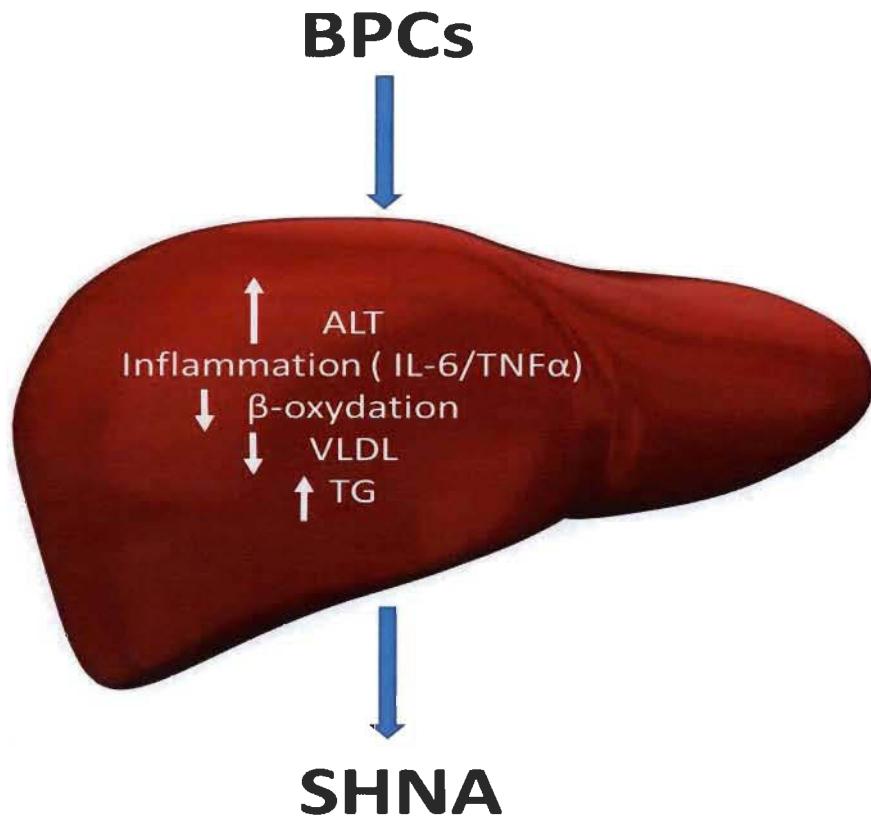


Figure 1.8 Schéma illustrant l'effet des BPCs sur le développement de la SHNA.

1.3 Mode d'action des BPCs

Les BPCs ont la capacité d'altérer le métabolisme lipidique, ce qui engendre une accumulation de lipides hépatiques et donc provoquer la toxicité par la production des ROS. De ce fait, les BPCs sont considérés parmi les facteurs menant à la SHNA. L'effet néfaste des BPCs amorce un processus de détoxicification par sa liaison au récepteur aryl hydrocarbone (AHR). En effet, dans son état inactif le AHR est localisé dans le cytoplasme et est stabilisé par un complexe de protéines chaperonnes telles que HSP90-P23 et AIP, une protéine interagissant avec l'AHR (AHR Interacting Protein). Suite à la liaison du ligand au récepteur, AHR est activé dans le complexe en changeant de conformation. Le ligand-AHR transloque dans le noyau et interagit avec le récepteur nucléaire ARNT (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) pour former un

hétérodimère. Le complexe AHR-ARNT se lie à la région XRE (xenobiotic response element) se trouvant sur le promoteur du gène cible. Cette liaison induit la production des cytochromes p450 (CYPs) afin d'assurer une absorption suffisante, une distribution et une élimination du xénobiotique du corps (Mandal 2005, Beischlag *et al.* 2008, Yelamanchi *et al.* 2016) (Figure 1.9).

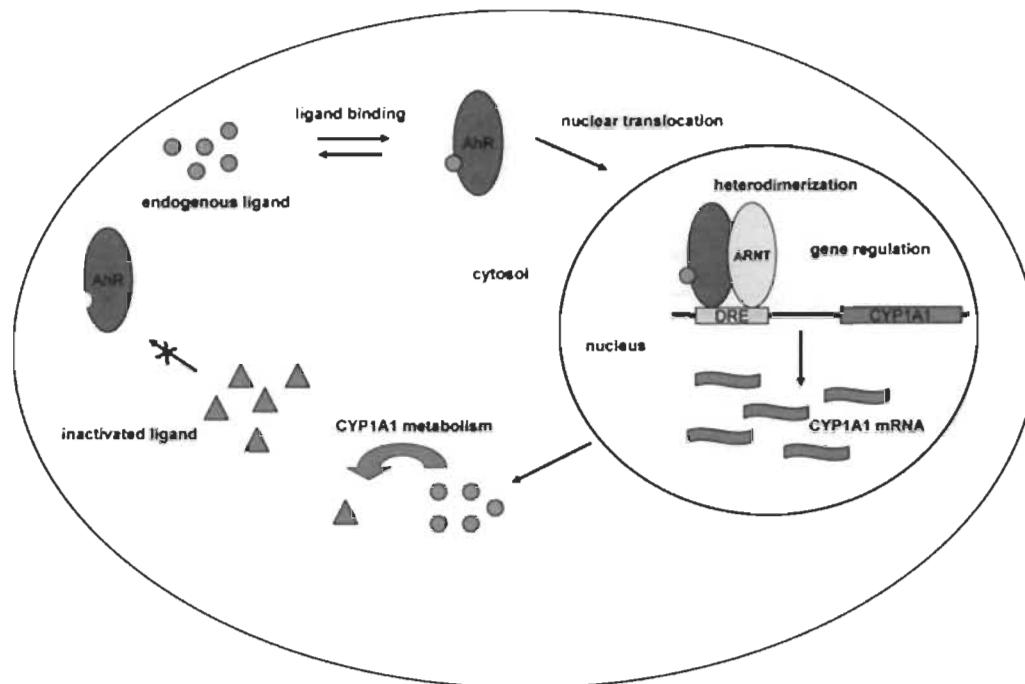


Figure 1.9 Mécanisme d'action de récepteur aryl hydrocarbone (AHR) (Beischlag *et al.* 2008).

La liaison du ligand endogène à l'AHR engendre la translocation du complexe dans le noyau. L'hétérodimère formé par l'ARNT et le complexe a une affinité pour la séquence d'ADN spécifique DRE (dioxin response element). L'interaction de l'hétérodimère induit la transcription de gènes du cytochrome P450 (CYPs). Les CYPs inactivent le ligand et procèdent ainsi à la détoxicification.

1.3.1 Détoxicification des BPCs

Les xénobiotiques tels que les BPCs sont sujets à de nombreuses réactions enzymatiques comme l'oxydation, la réduction, l'hydrolyse et les conjugaisons. Ils sont métabolisés de façon à les rendre plus polaires pour une élimination plus rapide. Et sont donc convertis en composés hydrophiles et sont par la suite éliminés par les urines (Testa

et al. 2012). Jusqu'à un certain point de contamination et une certaine quantité de toxicité, l'organisme est capable d'éliminer les dioxines. Pour cela, le métabolisme est doté d'un système détoxifiant se composant d'enzymes détoxifiantes, les CYPs. Les CYPs sont des enzymes ubiquitaires retrouvées dans tous les organismes vivants (Schlezinger *et al.* 1999) et majoritairement présents dans les hépatocytes au niveau du réticulum endoplasmique de la cellule, leur rôle est d'éliminer les toxines du métabolisme (Testa *et al.* 2012). Plus spécifiquement, ils interviennent dans des réactions d'oxydoréduction d'un grand nombre de molécules, qu'ils s'agissent de métabolites, xénobiotiques, polluants, toxines, drogues ou médicaments (Palrasu *et al.* 2017).

Les CYPs font partie d'une large famille d'hémoprotéines mono-oxygénases présentes à la fois chez les procaryotes et les eucaryotes. Une superfamille multigénique de protéines enzymatiques dites «hemo-thiolate» à propriétés redox. Les CYPs métabolisent un vaste nombre de composés endogènes et exogènes. Il existe plus de 57 formes différentes de CYPs, environ 10 CYPs hépatiques sont responsables du métabolisme oxydatif des xénobiotiques chez les humains et 7 CYPs sont responsables du métabolisme de 90 % de médicaments chez les humains. C'est ainsi qu'ils métabolisent les hydrocarbones aromatiques polycycliques, les amines aromatiques, les amines hétérocycliques, les pesticides et les herbicides. Ils ont la capacité d'activer les molécules de dioxygène en des entités hautement réactives (ROS) (Chiaro *et al.* 2007). Et d'insérer ensuite l'oxygène moléculaire dans un nombre important et varié de substrats sur les atomes de carbone, d'azote ou de soufre. Cette activation du dioxygène est rendue possible par la présence d'un atome de fer inclus dans l'hème qu'il porte (Preissner *et al.* 2013).

1.3.2 Modes d'action des CYPs

Afin de maintenir l'homéostasie cellulaire, un système enzymatique œuvre pour le contrôle des taux intracellulaires des xénobiotiques et leurs métabolites. Ce système consiste en différentes réactions enzymatiques qui métabolisent les xénobiotiques et les

exportent à l'extérieur de la cellule. Ce système s'effectue en passant par trois phases essentielles (Bury *et al.* 2014) (Figure 1.10).

Phase 0 :

La phase 0 se caractérise par l'import des xénobiotiques médié par les transporteurs SLC (Solute Carrier) défini comme des porteurs de solutés (Bury *et al.* 2014). Les SLCs sont des protéines membranaires qui contrôlent l'absorption et l'efflux de divers solutés, y compris les métabolites, les ions, les toxines et les médicaments. Les SLCs comprennent 386 membres regroupés en 52 familles sur la base de leurs séquences, le nombre d'hélices α transmembranaires et leurs fonctions biologiques. SLC21, SLC22, SLC15, SLC47 sont très abondants dans le foie, le rein et la barrière hémato-encéphalique où ils régulent l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination des drogues (Hediger *et al.* 2004).

Phase I :

Au cours de cette phase, les xénobiotiques chimiques lipophiles seront biotransformés afin d'être hydrophiles et facilement excrétés. Cette phase consiste en la biotransformation qui implique l'addition de nouveaux groupes fonctionnels au substrat (Bury *et al.* 2014). Des groupes polaires comme OH, COOH, SH, NH₂ sont ajoutés. Les CYPs induits vont se joindre au niveau basal de Cytochrome P450 déjà existant pour métaboliser le xénobiotique. Les réactions impliquées durant cette phase sont l'oxydation, l'hydroxylation, la réduction et l'hydrolyse afin de permettre au composé d'être plus soluble. Mais l'addition de ces groupes fonctionnels ne permet pas encore au substrat de devenir complètement hydrophile pour son excrétion (Deenen *et al.* 2011).

Phase II :

La phase II est une phase de conjugaison qui aboutit à la formation de substances conjuguées, hydrosolubles et facilement éliminées par les urines ou la bile.

Les métabolites subissent différentes réactions de conjugaison : glycuro-conjugaison, sulfo-conjugaison, acétylation, méthylation pour donner un produit conjugué qui sera éliminé. La conjugaison est le transfert sur un groupe fonctionnel (OH, NH₂, COOH) d'un composé de type sulfate, glucuronide, ou méthyl (Mieyal *et al.* 1994, Bury *et al.* 2014).

Phase III :

Cette phase consiste à l'élimination des métabolites devenus hydrosolubles. Les enzymes de la Phase III sont des transporteurs membranaires et exportent les métabolites conjugués de la cellule. Par exemple, l'enzyme MRP (Multidrug Resistance-Associated Protein) utilise l'énergie de l'ATP hydrolysée pour transporter le métabolite conjugué à travers la cellule. Ce type de transporteurs fait partie de la superfamille ABC (ATP Binding Cassette) (Loncar *et al.* 2010, Bury *et al.* 2014).

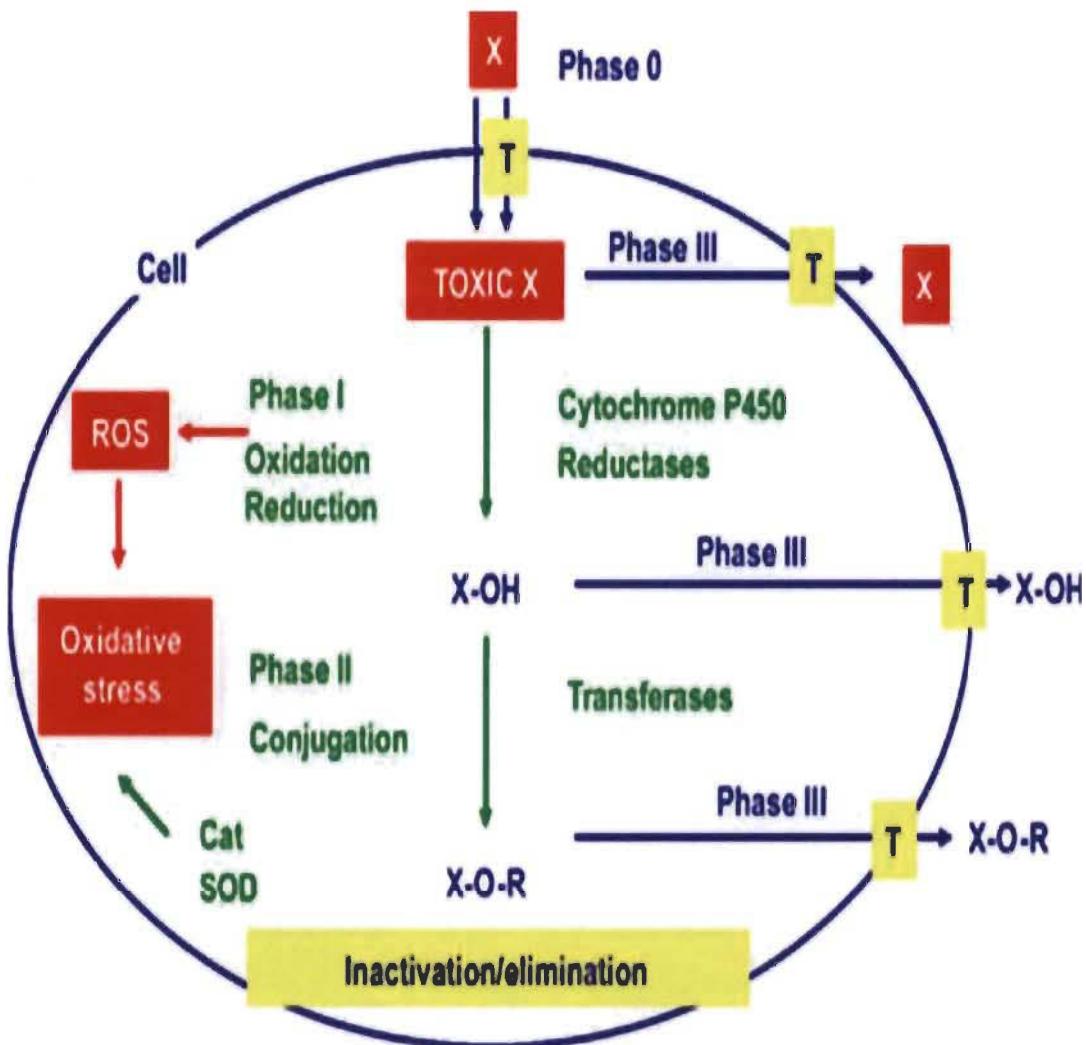


Figure 1.10 Système de contrôle des xénobiotiques (Bury *et al.* 2014).

X, xénobiotique; X-OH, xénobiotique hydroxylé; X-O-R, xénobiotique conjugué avec des espèces hydrophiles comme le glutathione, sulfate, glycine, groupe acétyle ou acide glucuronique; ROS : espèce réactive d'oxygène; Cat : catalase; SOD : superoxyde dismutase; T : transporteur. Phase 0 : l'import des xénobiotiques est par des transporteurs comme SLCO1, SLCO2, SLC15, SLC22 et SLC47; phase I : biotransformation, phase II : conjugaison, phase III : élimination.

1.4 Effets de l'entraînement sur le métabolisme

Comme détaillé ci-dessus, les BPCs altèrent le métabolisme hépatique et induisent une accumulation lipidique, un facteur clé dans le développement de la SHNA. Dans la mesure où il n'existe pas encore de traitements cibles efficaces pour la SHNA,

l'entraînement reste la seule alternative (Brunt *et al.* 2011). En effet, les médicaments actuellement utilisés ont pour but d'alléger les symptômes et non de contrer la maladie en tant que telle. On peut citer comme exemple la metformine utilisée en diabète de type 2 qui corrige la résistance à l'insuline, les statines pour la réduire dyslipidémie en inhibant l'enzyme HMG CoA réductase se soldant par une diminution du cholestérol, des VLDL et LDL et l'acide ursodéoxycholique (UDCA), un agent cytoprotecteur qui prévient l'apoptose et régule la voie de l'inflammation (Hardy *et al.* 2015). Cependant, une perte de poids et une bonne hygiène alimentaire faible en gras restent les premières étapes pour contrôler l'évolution de la SHNA en réduisant la quantité de triglycérides hépatique et atténuer l'inflammation (Houghton *et al.* 2017). Néanmoins, l'effet de l'entraînement a été étudié et documenté majoritairement dans le muscle squelettique. Il a été montré que l'entraînement stimule l'oxydation des AGs en augmentant la densité mitochondriale, ce qui favorise la capacité d'oxydation et accroît le flux du cycle de Krebs (Halling *et al.* 2017, Meinild Lundby *et al.* 2017) Il a été également observé que l'entraînement induit une prolifération des capillaires à l'intérieur des muscles, ce qui facilite l'acheminement des AGs aux muscles. En outre, il engendre une augmentation des transporteurs des AGs à travers les mitochondries (CPT-1) (Oscai 1981, Gadupudi *et al.* 2015, Wyckelsma *et al.* 2017).

Par contre, quant à l'effet de l'entraînement sur le foie, peu de données existent. Une étude menée chez des rats entraînés a montré une augmentation de la glycogénèse hépatique suite à l'activation du facteur de transcription CREB qui régule certains gènes gluconéogéniques comme PEPCK (Leahy *et al.* 1999, Leithner 2015). Par ailleurs, une autre étude a démontré que entraînement en endurance induit une augmentation de la biogenèse mitochondriale hépatique et améliore la capacité oxydative mitochondriale hépatique des AGs. Par conséquent, la synthèse d'AGs est diminuée (Laye *et al.* 2009). De plus, suite à l'entraînement, l'activité du CPT-1 est augmentée, ce qui permet l'entrée de l'acyl-CoA à l'intérieur des mitochondries pour son oxydation. L'activation du CPT-1 est induite par la diminution de la formation de malonyl-CoA, car la production du malonyl-CoA inhibe la CPT-1 (Rector *et al.* 2008). L'entraînement prévient également l'accumulation de TGs hépatiques (Yasari *et al.* 2006).

Pour résumer, les études menées chez les mammifères ont mis en évidence le rôle de l'entraînement en endurance, particulièrement sur le métabolisme lipidique. En effet, il diminue l'accumulation des TGs en agissant sur l'oxydation des AGs. De ce fait, il augmente la capacité oxydative mitochondriale, ainsi que l'activité des enzymes impliqués dans le transport des AGs aux mitochondries dans les muscles squelettiques et le foie.

1.4.1 Effets de l'entraînement sur la SHNA

Néanmoins, la détoxicification par le métabolisme n'est pas dans tous les cas efficace. En effet, les CYPs peuvent être inactivés par une forte dose de BPC. Comme mentionné plus haut, il n'y a pas encore de remède efficace, on traite seulement les symptômes. Pour cette raison, les études se sont multipliées afin de montrer l'importance de l'exercice physique comme traitement potentiel de la SHNA. Les investigations ont démontré plusieurs effets de l'exercice à différents niveaux. Parmi les premiers effets de l'exercice constatés, on mentionne la baisse de l'enzyme ALT qui a été notée chez des sujets souffrant d'une SHNA, mais pratiquant une activité physique comparés aux sujets sédentaires (Kistler *et al.* 2011). Cette enzyme est un indicateur le plus couramment employé pour déceler les lésions hépatocellulaires et est normalement présente dans les cellules du foie; lorsque ces cellules sont endommagées, les enzymes s'en échappent et se retrouvent dans le sang. L'ALT est considérée comme un indicateur plus spécifique de l'inflammation du foie (Brunt *et al.* 2011, Kistler *et al.* 2011). Cependant, l'entraînement seul n'a pas d'effets significatifs sur la baisse du taux d'ALT dans le sérum et il doit être combiné à une diète faible en lipide. Par contre, l'effet de l'entraînement sur la quantité de gras dans le foie est observé sans le suivi d'une diète particulière. (Keating *et al.* 2012).

Au niveau clinique, des études menées auprès de patients atteints de SHNA ont montré que l'exercice quotidien augmente la quantité de transporteurs lipidiques les VLDLs, qui sont des lipoprotéines responsables du transfert des lipides endogènes de leur lieu de synthèse, le foie, vers les tissus. Les VLDLs baissent la quantité de

triglycérides intra-hépatiques (IHTG) et améliorent également la sensibilité de l'insuline (Golabi *et al.* 2016, Shojaee-Moradie *et al.* 2016).

Au niveau métabolique et fondamental, l'entraînement favorise la fonction mitochondriale/peroxysomale hépatique. En effet, il a été démontré que l'exercice quotidien chez des sujets atteints de SHNA augmente la β -oxydation du palmitate en CO_2 de trois fois comparé aux sujets sédentaires ayant la SHNA (Rector *et al.* 2008). De surcroit, une étude plus approfondie a montré que les rats entraînés avaient une meilleure oxydation des AGs. Et ceci a été démontré en explorant les mécanismes induisant la β -oxydation plus en détails (Morifuji *et al.* 2006). Parmi les protéines pivots œuvrant dans ce mécanisme, on cite l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (ACC). C'est un enzyme qui est régulé négativement, en d'autres termes sa phosphorylation l'inactive. Par contre, son activation stimule la production de la malonyl-CoA réductase. Cet enzyme inhibe le transfert du groupe acyle gras de l'acyl-CoA et donc empêche l'amorçage de la β -oxydation (Palou *et al.* 2008) Une augmentation de l'enzyme acétyl-CoA carboxylase phosphorylé (p-ACC) ainsi qu'une baisse de l'enzyme ACC total a été constaté suite à l'entraînement (Meng *et al.* 2014). Une étude menée chez le rats, a montré que l'exercice aigu et chronique entraîne la phosphorylation d'ACC et par conséquent inhibe la synthèse de TGs et augmente l'oxydation des AGs (Yi *et al.* 2013) En plus, des analyses histologiques ont montré une régression de la quantité des vésicules lipidiques observées dans le foie suite à l'entraînement (Hickman *et al.* 2004, Yi *et al.* 2013). En somme, l'entraînement réduit le développement de la SHNA en favorisant le transport des lipides vers les tissus, et en stimulant la dégradation lipidique et en activant la β -oxydation. (Figure 1.11).

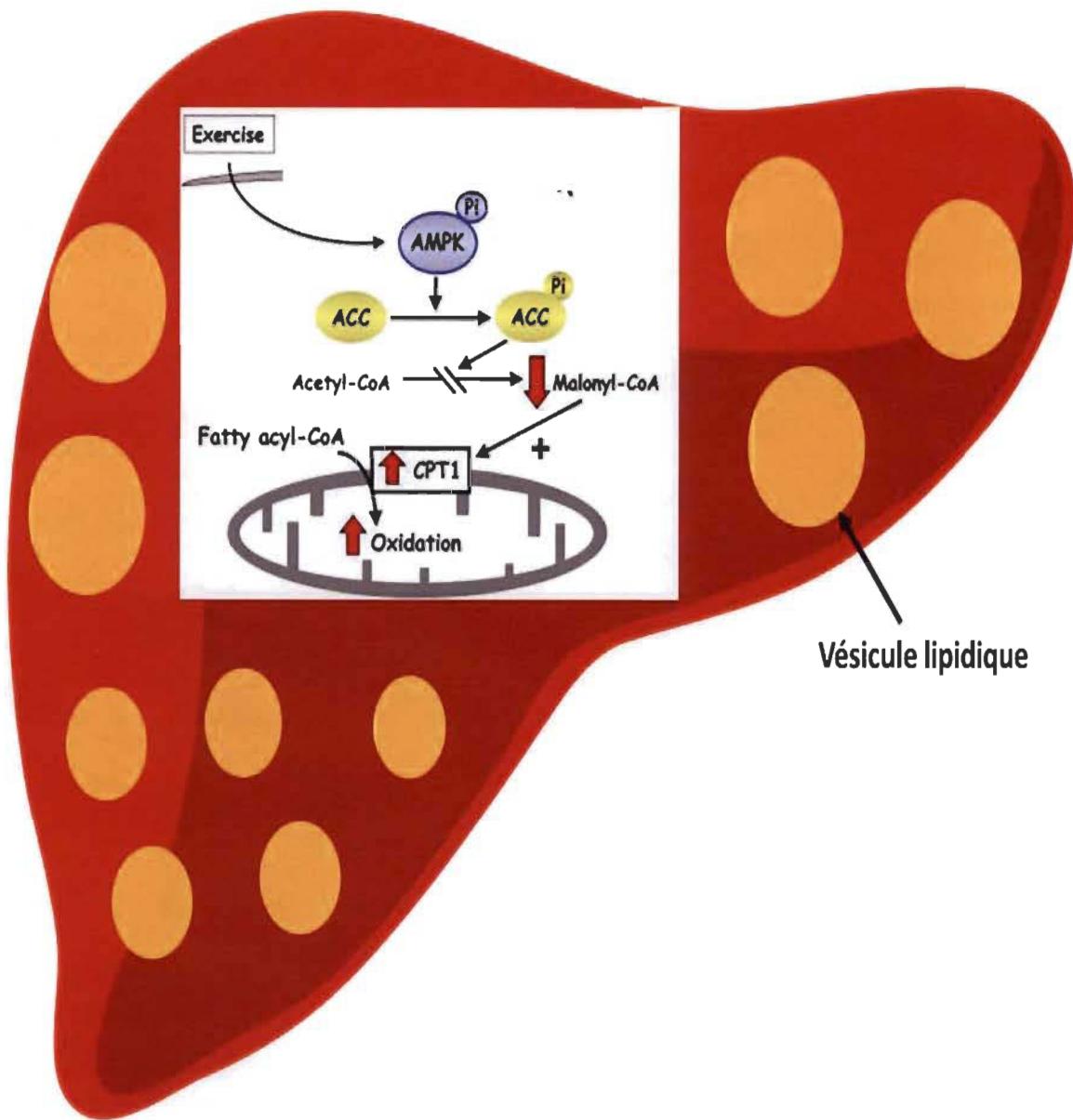


Figure 1.11 Résumé de l'effet de l'exercice physique sur la SHNA. (Adaptée de Kahn *et al.* 2005.)

L'activation de la protéine AMPK suite à l'exercice physique phosphoryle l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (ACC), ce qui l'inhibe et ne permet plus la conversion de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA. Une baisse des taux de malonyl-CoA enlève l'inhibition de la carnitine palmitoyl-CoA transferase-1 (CPT1) et permet donc aux AGs aux longues chaînes de rentrer dans la mitochondrie où se déroule leur oxydation et ainsi l'accumulation de lipides dans les hépatocytes est atténuée.

1.5 Hypothèse

L'exposition aux BPCs altère le mécanisme lipidique en bloquant le mécanisme de dégradation des AGs, soit la β -oxydation, ce qui peut mener à une accumulation de lipides dans le foie et engendre éventuellement le développement de la SHNA qui se caractérise fondamentalement par un dysfonctionnement mitochondrial et peroxysomale et donc une diminution de la β -oxydation. L'entraînement semble être un alternatif potentiel pour contrer la SHNA, supportant l'hypothèse de ce projet de maîtrise de mettre en évidence l'atténuation par l'entraînement de l'accumulation des vésicules lipidiques hépatiques suite à une exposition au BPC126.

Pour ceci, nous avons exploré deux pistes impliquées dans la dégradation des lipides. La première est la lipophagie qui se définit comme une interrelation entre l'autophagie et le métabolisme lipidique (Ward *et al.* 2016). Donc c'est un processus catabolique dégradant les vésicules lipidiques. Des études ont montré que l'inhibition de l'autophagie augmente les TGs et les vésicules lipidiques (Singh *et al.* 2009, Xiong *et al.* 2016, Sathyaranayanan *et al.* 2017). Le mécanisme procède en séquestrant les vésicules lipidiques à l'intérieur de doubles membranes qui forment l'autophagosome. Par la suite, l'autophagosome fusionne avec un lysosome pour former l'autolysosome où le lysosome déverse son contenu enzymatique afin de dégrader les lipides. Le lysosome contient des lipases appelées lipases acides lysosomales qui sont donc spécifiques aux lipides (LALs) (Figure 1.12) (Singh *et al.* 2009, Liu *et al.* 2015).

Le deuxième mécanisme pour la dégradation des lipides est la β -oxydation. En effet, les TGs sont dégradés en AGs suite à l'action de lipases ou de lipases hormono-sensibles (HSL) dans le sang (Sekiya *et al.* 2008). Les AGs rentrent dans les hépatocytes via des transporteurs FATP (Fatty Acid Transport Protein) ou FAT (Fatty Acid Translocase, CD36) par diffusion. Une fois dans le cytosol hépatique, les AGs vont être activés en acyl-CoA, par la protéine FABP (Fatty Binding Protein) ou acyl-CoA synthétase qui se trouvent à l'intérieur des microsomes et à l'extérieur des membranes des mitochondries (McIntosh *et al.* 2014). L'acyl-CoA formé sera destiné à la β -oxydation. La β -oxydation se déroule dans les mitochondries ou dans les peroxysomes

dépendamment de la longueur des chaînes d'AGs (Mannaerts *et al.* 1993, Wanders *et al.* 2010) La β -oxydation peroxisomale est responsable du métabolisme des très longues chaînes d'acides gras > 22 atomes de carbones alors que la β -oxydation mitochondriale est responsable du métabolisme des courtes, moyennes et longues chaînes d'acides gras (Ferdinandusse *et al.* 2000). La β -oxydation résulte à la formation d'acétyl-CoA comme un produit final (Mashek *et al.* 2004). Durant ce processus, les électrons sont transférés à la dinucléotide flavin-adénine (FAD) et à la forme oxydée de la dinucléotide nicotinamide-adénine (NAD⁺) aboutissant à la forme réduite de ces coenzymes qui à leur tour donnent les électrons à la chaîne de transport d'électrons pour la synthèse d'ATP (Hiltunen *et al.* 2000). Pour les acides gras, de longues chaînes > 14 carbones rentrent dans la mitochondrie sous l'action de la CPTI de la membrane mitochondriale externe (van Vlies *et al.* 2007). Concernant les acides gras de 12 atomes de carbone ou moins, ils peuvent traverser la membrane mitochondriale et sont activés par les acyl-CoA synthases à l'intérieur de la matrice mitochondriale. Ainsi la β -oxydation peut alors commencer par une série de réactions nécessitant des enzymes spécifiques : déshydrogénéation (acyl-CoA-déshydrogénase), hydratation (enoyl-coa hydrolase), oxydation (3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase) et thiolyse (acétyl-CoA c-acyltransférase) (Wanders *et al.* 2010). La dégradation complète de l'acide gras se poursuit jusqu'à ce que la chaîne carbonée soit complètement découpée en molécules d'acétyl-CoA (Nguyen *et al.* 2008). Les grandes lignes des étapes de la β -oxydation sont schématisées dans la figure 1.13. Afin d'investiguer les deux voies, nous avons évalué la variation de différentes composantes de la lipophagie et de la β -oxydation suite à une exposition au BPC126 et à l'entraînement de trois semaines dans un modèle animal.

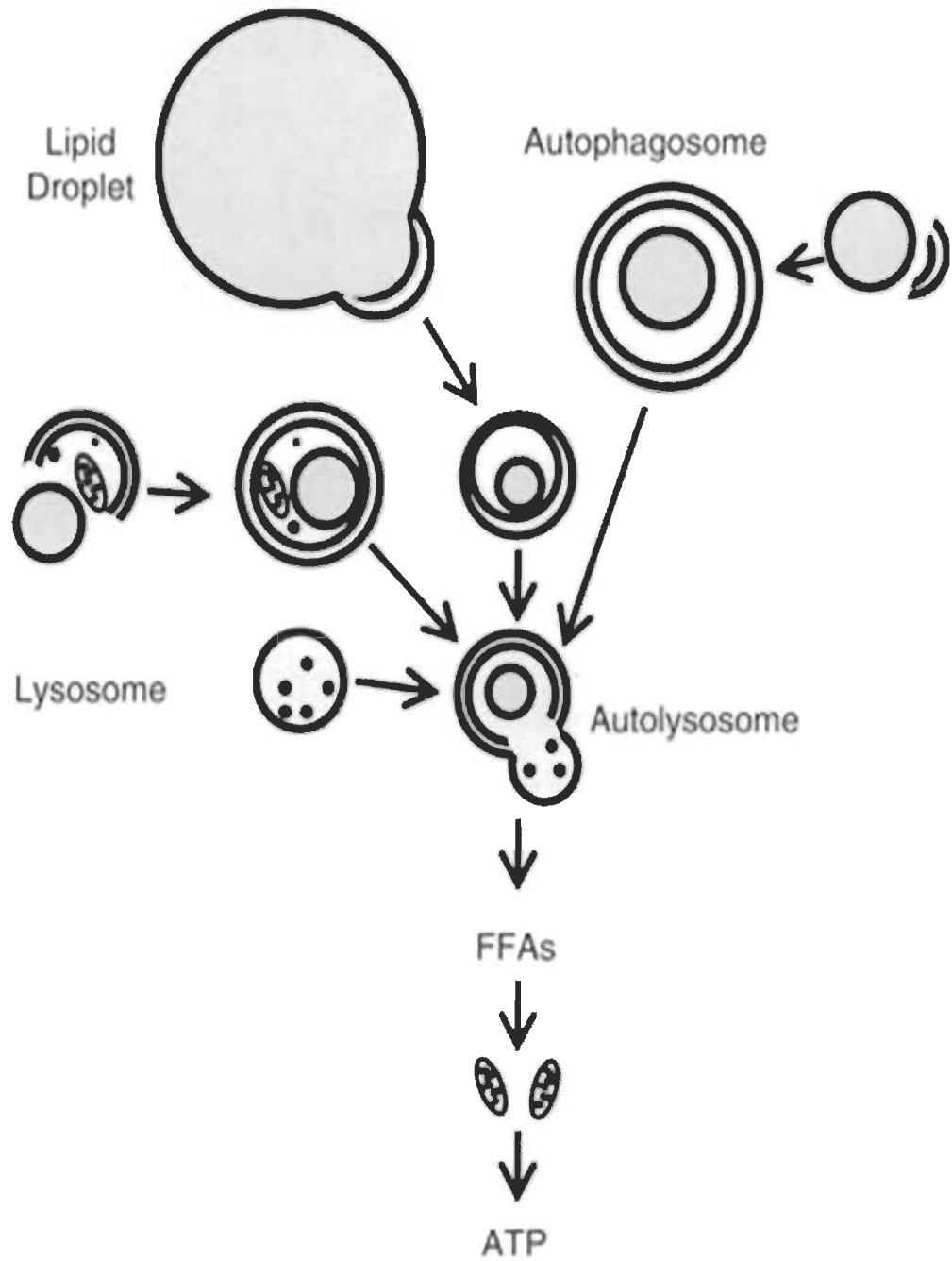


Figure 1.12 Dégradation des lipides par lipophagie (K Liu *et al*, 2013).

Les vésicules lipidiques (LDs) sont séquestrées à l'intérieur des phagosomes et sont ensuite dégradées via les LALs suite à leur fusion aux lysosomes. Les acides gras libres résultants sont utilisés pour fournir de l'énergie.

LALs : lipases acides lysosomales.

FFAs (Free Fatty Acid): acides gras libres.

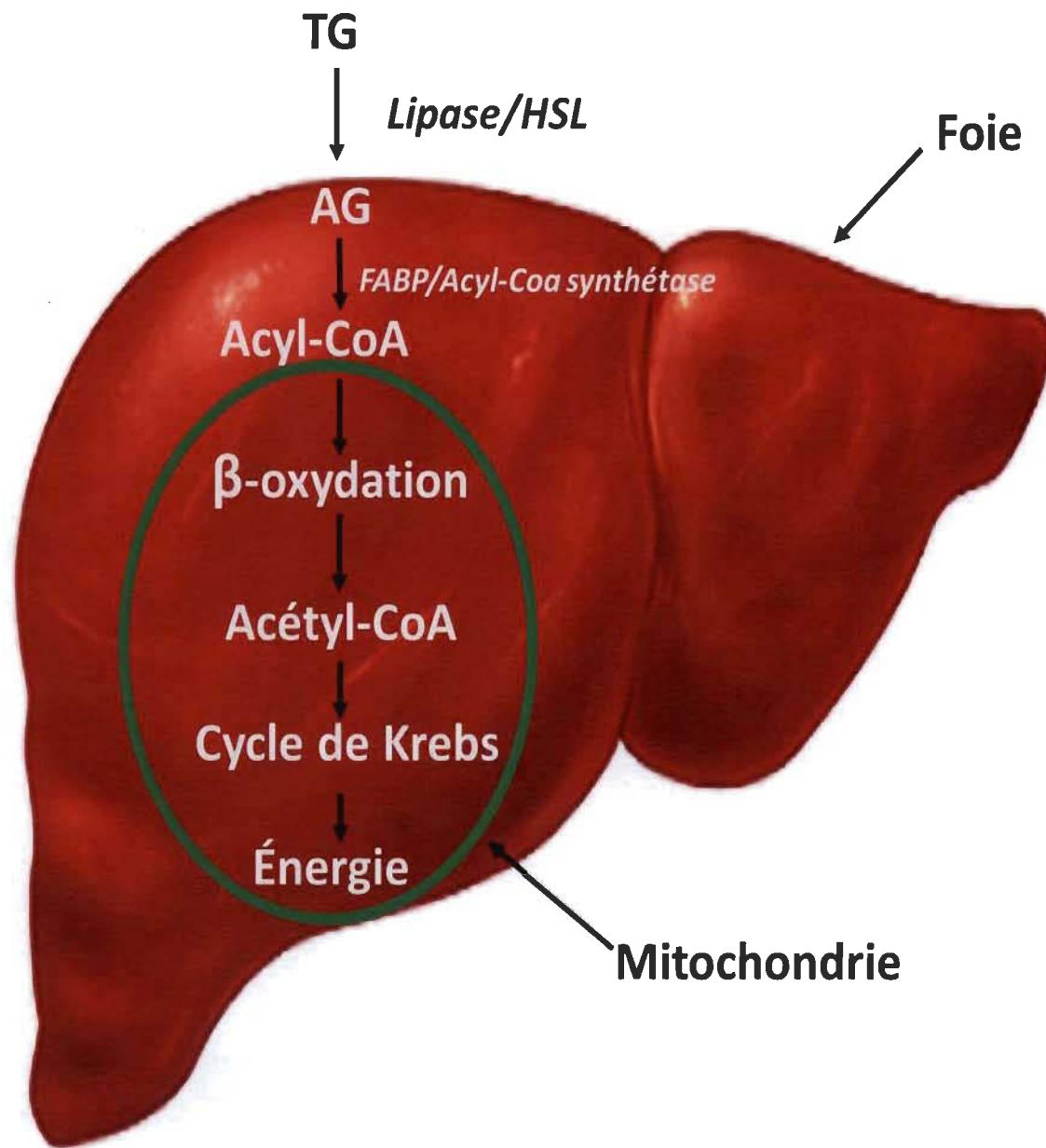


Figure 1.13 Schéma résumant les étapes de la β -oxydation.

Les TGs sont dégradés en AGs par les enzymes lipases ou HSL, par la suite les AGs rentrent dans les hépatocytes et sont activés en acyl-CoA par la protéine FABP et l'enzyme acyl-CoA synthase. L'acyl-CoA intègre la mitochondrie et subit la β -oxydation. L'acétyl-CoA formé rejoint le cycle de Krebs pour y être converti en coenzymes pour faire l'énergie, ATP par la phosphorylation oxydative.

1.5.1 Objectifs et résultats

En vue du lien déjà documenté et établi entre l'entraînement et la SHNA, l'hypothèse émise était que l'entraînement pourrait atténuer les désordres du métabolisme hépatique engendrés suite à une exposition au BPC126.

Ces travaux visaient à déterminer 1) l'effet du BPC126 sur le métabolisme hépatique et 2) l'effet de l'entraînement sur les mécanismes intra-hépatiques altérés par le BPC126. Pour ceci, des coupes d'hépatocytes ont été colorées avec l'Oil Red O afin d'apprécier les vésicules lipidiques autant aux niveaux quantitatif que qualitatif. Ensuite, nous avons investigué la voie de dégradation des lipides en commençant par mesurer l'expression de transporteurs protéiques, FABP1 et PPAR α , des AGs vers les mitochondries/peroxysomes pour la dégradation soit par la β -oxydation ou par la lipophagie/autophagie. Nous avons évalué d'une part l'expression de marqueurs spécifiques autophagiques et lysosomaux, (p62 et LC3 II, LAMP1 et LAMP2), ainsi que l'activité lysosomale, LAL (Banduseela *et al.* 2013). De plus, nous avons mesuré l'expression de protéines impliquées dans la biogenèse mitochondriale, (PGC1 α , mtHSP70), et peroxysomale, (PEX19 et PMP70) (Figure 1.14). La méthodologie utilisée et les résultats seront détaillés dans les sections suivantes. En somme, les résultats évoquent que l'entraînement diminuerait les lipides accumulés par l'effet du BPC126 en favorisant la voie de la β -oxydation.

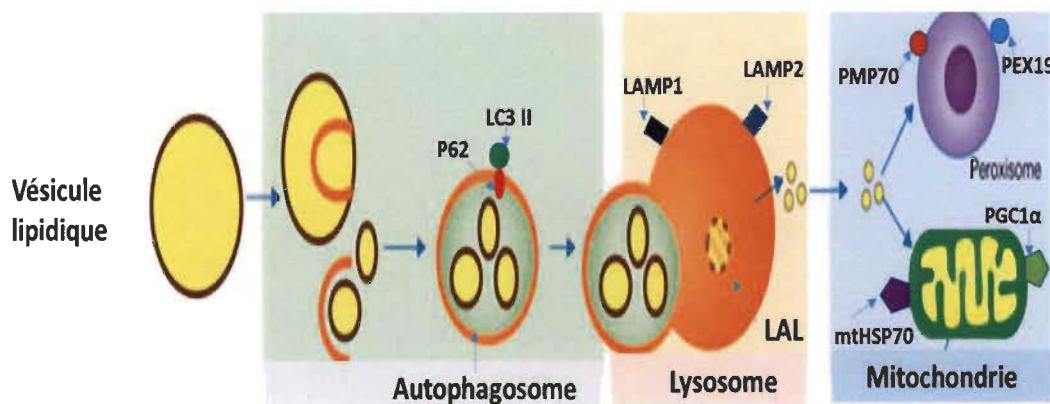


Figure 1.14 Illustration des protéines impliquées dans la lipophagie. (Adaptée de Xie *et al.* 2007.)

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Animaux et protocole expérimental

L'expérience a été approuvée par le Comité des soins des animaux de l'Université d'Ottawa et adhère aux directives établies par le Conseil canadien sur les soins des animaux. Des rats mâles Sprague-Dawley (Charles River, St-Constant, Québec, Canada), pesant entre 200-250 g à leur arrivée, ils ont été logés par paires et ont eu accès à la nourriture et à l'eau à volonté. Leur environnement a été contrôlé en termes de lumière (12 :12 - cycle lumière-noir commençant à 6 h du matin), humidité et température ambiante (20-23°C). Tous les rats ont été alimentés avec un régime standard (Diète 2018 de rongeur, Harlan Teklad Laboratory) et ont eu accès à l'eau à volonté. Ils ont été aléatoirement affectés à deux groupes. Chacun des deux ont été injectés avec le BPC126 (1,05 µmol/kg) véhiculé avec de l'huile de maïs. Un groupe était sédentaire et le deuxième a été entraîné pendant trois semaines à la nage. Les groupes témoins ont reçu une injection intra-péritonéale (IP) d'huile de maïs (0,14 ml/kg) et le groupe témoin entraîné a été également entraîné à la nage pendant trois semaines. Quarante-huit heures après la fin du protocole d'entraînement, les rats ont été sacrifiés suite à une anesthésie rapide et profonde utilisant pentobarbital de sodium (65 mg/kg, en IP), l'abdomen a été ouvert, les lobes de foie ont été excisés et la prise de sang a été rapidement effectuée. Les lobes de foie étaient immersés dans l'azote liquide et congelés dans -80 °C jusqu'à l'analyse. Le foie a été utilisé pour l'immunobuvardage de type Western blot, la coloration avec l'Oil Red O et les activités enzymatiques lysosomales.

2.2 Procédures expérimentales

2.2.1 Anticorps et réactifs

Western blot: FABP1, PPAR α , LC3-II, PMP70, PEX19, (Novus Biologicals, Oakville, ON, Canada), PGCl α , mtHSP70, p62, (Cell Signaling, Whitby, ON, Canada).

Tous les réactifs nécessaires à la mesure de l'activité lysosomale (LAL) et le colorant Oil Red O proviennent de la compagnie Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA.

2.2.2 Coloration à l'oil Red O (ORO)

Préparation de la solution

0,7 mg d'ORO ont été dissous dans 100 ml de propylène glycol. La solution a été chauffée à 100 °C au bain-marie, pendant quelques minutes et filtrée à l'aide du papier filtre.

Protocole expérimental

Des coupes de foie de 12 microns ont été réalisées à l'aide du cryostat et ont été déposées sur lames et par la suite stockées à -80 °C jusqu'à l'utilisation. Les lames ont été couvertes de paraformaldéhyde 4 % pendant 15 min à la température ambiante. Les sections de tissus ont été lavées avec du PBS 1X pendant 5 minutes, trois fois. Chaque section de tissu a été encerclée avec l'Immuno pen (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA). Ce stylo sert à tracer un cercle hydrophobe autour du tissu et ainsi empêche le l'écoulement des réactifs en maintenant le liquide à l'intérieur du cercle. Ce cercle insoluble dans l'éthanol, l'acétone et l'eau, mais s'enlèvera avec du xylène.

Ensuite, les lames ont été recouvertes de propylène glycol 100 % pendant 10 minutes à température ambiante pour permettre l'adhésion du colorant au tissu. Le propylène glycol a été enlevé en secouant légèrement et la solution d'ORO a été ajoutée pour une incubation de 10 minutes et enlevée en secouant légèrement. Puis les

tissus ont été couverts de propylène glycol 85 % pendant 3 minutes et ensuite lavés à l'eau distillée. Les lames ont été immergées dans l'hématoxyline, un colorant spécifique au noyau pendant 2 minutes et lavées dans l'eau jusqu'à ce que tout l'excès de colorant disparaisse. Au final, les lames ont été séchées et des lamelles ont été collées par-dessus en utilisant la colle Immumount (Fisher Scientific, Waltham thermo, États-Unis). Finalement, les lames ont été analysées par microscopie optique et les gouttelettes lipidiques ont été analysées avec le programme Image J.

2.2.3 Immunobuvardage de type Western (WB)

Des hépatocytes ont été lysés dans un tampon de lyse composé de Tris-HCL 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM et Triton 5 %. Le dosage des protéines totales dans les échantillons obtenus a été réalisé par la méthode du DC protein assay (BioRad); la lecture des densités optiques a été faite à l'aide du lecteur de plaques Fluostar Optima (BMG LABTECH, Ortenberg, Allemagne). Un total de 50 µg d'homogénat de protéines de foie de chaque animal a été chargé et séparé dans des gels d'acrylamide et soumis à une électrophorèse en conditions dénaturantes. Des protéines ont été transférées sur des membranes de nitrocellulose pendant 1 h 10 à 300 mA. Ces membranes ont été bloquées avec du lait 5 % pendant 45 minutes et incubées avec un anticorps primaire et par la suite un anticorps secondaire anti-lapin. La β -actine conjuguée à la peroxydase de raifort a été employée comme contrôle pour mesurer les protéines. Les signaux des bandes ont été visualisés utilisant les solutions chimioluminescentes A et B de Femto (Thermo Fisher Sci, Waltham, États-Unis). L'analyse des membranes a été exécutée dans la chambre noire d'Epi Chemi II (Montagne, CA, et États-Unis d'UVP Bioimaging). L'analyse des densités des bandes de protéines a été mesurée utilisant le programme ImageJ.

2.2.4 Mesure de l'activité de la lipase acide lysosomale (LAL)

L'activité de la lipase acide lysosomale a été mesurée en diluant 10 µg de protéines dans 100 µl dans une solution tampon (Acétate pH 4,0, 1 % v/v Triton et 0,5 %

Cardiolipin de sodium de 100 mM de poids/volume) en présence du Méthylumbelliféron 0,345 mM. Les échantillons étaient incubés pendant 1 h à 37 °C et la fluorescence ont été mesurés mesurée à (Ex/Em 360/440).

2.2.5 Analyses statistiques

Les données exprimées en moyenne \pm SEM ont été traitées selon la méthode one-way ANOVA en utilisant le logiciel PRISM (GraphPad). Dans le cas des tests ANOVA, le post-test Tukey a été appliqué. Pour être concluants et statistiquement significatifs, les résultats devaient provenir d'au moins trois expériences indépendantes et générer une valeur $P < 0,05$.

CHAPITRE III

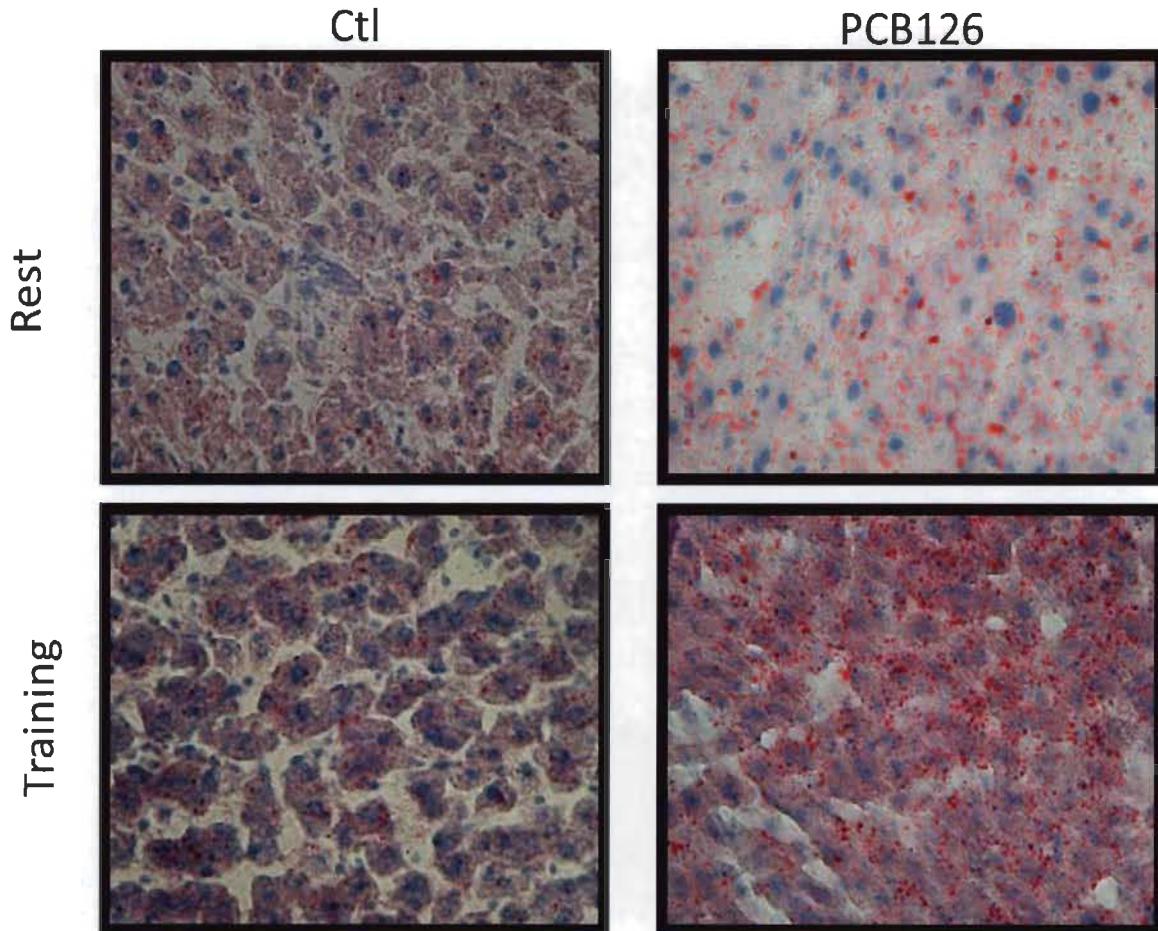
RÉSULTATS

3.1 L'entraînement réduit la taille des vésicules lipidiques chez les rats exposés au BPC126

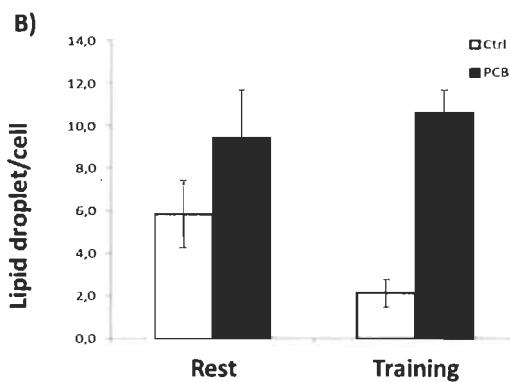
L'inactivité physique est un facteur prépondérant qui induit la résistance à l'insuline, ce qui se traduit par une hyperinsulinémie (Weiss *et al.* 2007). L'hyperinsulinémie augmente la lipogenèse de *novo*, ce qui engendre la SHNA (Booth *et al.* 2008). Il a été montré que l'entraînement améliore le métabolisme lipidique et diminue l'accumulation de lipide hépatique dans la SHNA (Alex *et al.* 2015, Golabi *et al.* 2016). Comme l'injection d'une simple dose de BPC126 à des rats, provoque l'accumulation lipidique tant hépatique que des triglycérides plasmatiques suite à une semaine d'exposition (Boucher *et al.* 2015), nous avons utilisé ce modèle pour mesurer l'effet de l'entraînement sur l'accumulation de lipides hépatiques. Dans les conditions que nous avons utilisées, l'accumulation de gouttelettes lipidiques n'était pas significative chez les animaux sédentaires et traités au BPC126 (Figure 3.1B). Cependant, une séance d'entraînement de trois semaines en combinaison avec le BPC126, a réduit la taille de gouttelettes lipidiques présentes dans les hépatocytes, comme déterminé avec l'analyse de la coloration à l'Oil Red O, mais pas leur nombre (Figure 3.1A-C). Cette diminution du contenu lipidique chez les rats entraînés et traités au BPC126 a été accompagnée par une augmentation de la quantité de FABP1 dans la même condition (Figure 3.1D). FABP1 est un transporteur d'acide gras cytoplasmique nécessaire pour le transport d'acides gras et d'autres substances lipophiles aux mitochondries et aux peroxysomes pour leur β -oxydation (Guzman *et al.* 2013). De plus, alors que l'accumulation de lipides hépatiques a été associée à une augmentation de l'ARNm de PPAR α (Chapados *et al.* 2016), un régulateur clé des gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras (Monsalve *et al.* 2013), nous n'avons pas observé de changement au niveau de la protéine (Figure 3.1E).

En somme, une injection de BPC126 a induit l'augmentation du contenu lipidique hépatique. Cela suggère qu'une simple dose de BPC126 est suffisante pour perturber le métabolisme lipidique hépatique et ceci n'est que partiellement inversé par l'entraînement.

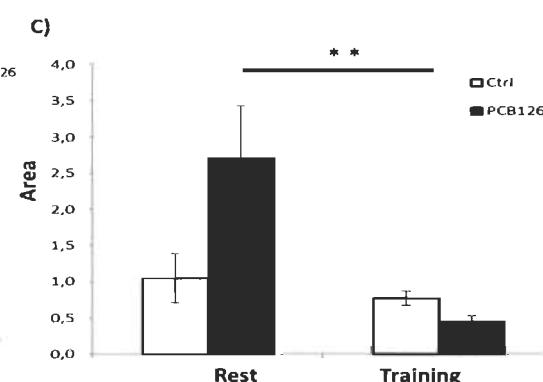
A)



B)



C)



**

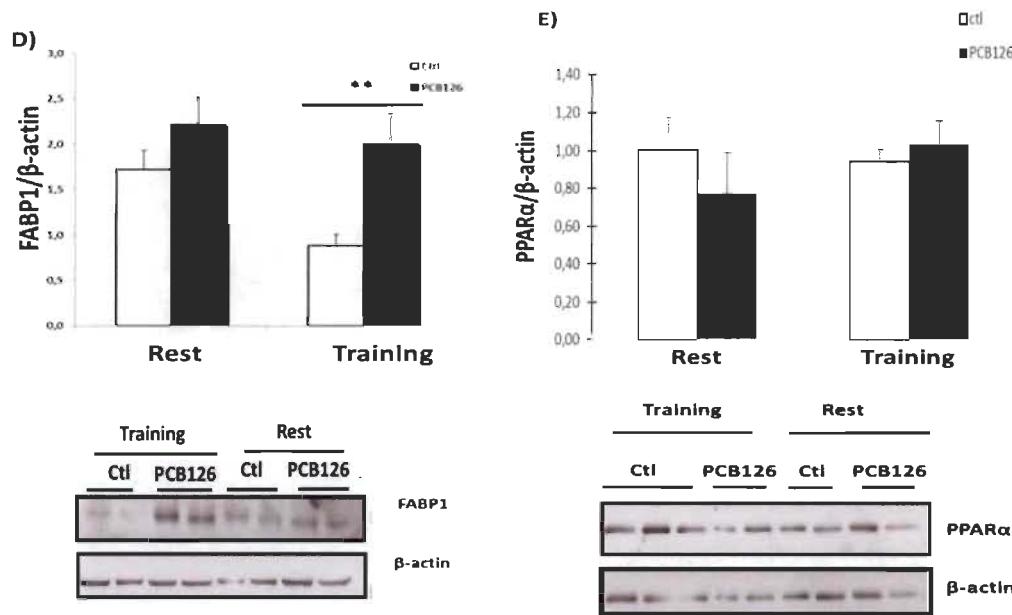


Figure 3.1 L'entraînement diminue la taille des vésicules lipidiques accumulées suite au BPC126.

(A-C) Altérations des lipides dans le foie de rats exposés au BPC126 avec ou sans entraînement. (A) Sections de foie de rats colorées à l'hématoxyline et à l'ORO et analysées par microscope optique (Épaisseur : 12 μ , objectif : 40 X). (B-C) Quantification du nombre (B) et de la taille (C) des gouttelettes lipidiques. La quantification a été réalisée avec le logiciel ImageJ. (D-E) Altération de marqueurs du métabolisme lipidique suite à l'exposition au BPC126. L'expression de FABP1 (D) et de PPAR α (E) a été mesurée par western blot. La quantification a été réalisée avec ImageJ en prenant l'actine comme contrôle. Les barres sont les erreurs standard; * représente $p < 0,05$; ANOVA bilatérale, reste de Ctl et reste de PCB126 : $n=5$, entraînement contrôle et entraînement PCB126, $n=5$).

3.2 L'exposition au BPC126 diminue l'activité lysosomale mais pas l'autophagie

Les gouttelettes lipidiques sont enlevées du cytoplasme par le mécanisme d'autophagie (lypophagie), un processus dans lequel une gouttelette lipidique est incorporée dans une double structure membraneuse appelée un autophagosome et est livrée à un lysosome pour la dégradation. Pendant la formation de l'autophagosome, la lipidation de LC3 et son incorporation dans l'autophagosome naissant peut être visualisé comme une bande dans un Western blot (LC3-II) et sert ainsi de marqueur d'induction d'autophagie (Klionsky *et al.* 2016). Pour déterminer l'effet de l'entraînement et du

BPC126 sur l'activation de l'autophagie, nous avons mesuré ainsi les niveaux LC3-II. Chez les animaux sédentaires ou entraînés, l'exposition au BPC126 n'a pas affecté les niveaux d'expression de LC3-II (Figure 3.2A). Ceci suggère que l'autophagie n'est pas induite chez les animaux exposés au BPC126. Afin d'investiguer plus en profondeur, nous avons par la suite mesuré le flux d'autophagique en utilisant la protéine p62, un substrat de l'autophagie.

Pendant l'autophagie, p62 est incorporée dans l'autophagosome naissant et dégradée dans les lysosomes (Glick *et al.* 2010). La diminution des niveaux de p62 est ainsi un marqueur de flux d'autophagie augmenté, soit la livraison de p62 aux lysosomes et leur dégradation ultérieure. Les niveaux de p62 n'ont pas été changés par l'entraînement ou l'exposition au BPC126 (Figure 3.2B), suggérant que le flux d'autophagique n'est pas augmenté sous ces conditions. Toutefois, même si les niveaux de p62 sont un indicateur robuste du flux autophagique *in vivo* (Pankiv *et al.* 2007), ses niveaux peuvent aussi être transcriptionnellement modulés. Donc, pour investiguer plus en profondeur la dégradation lysosomale des lipides, nous avons mesuré l'activité de la lipase acide lysosomale (LAL). LAL est une enzyme critique exigée pour la dégradation du cholestérol esters et triglycerides en cholestérol et AGs dans le lysosome. Les AGs libres sont alors exportés vers les mitochondries ou les peroxysomes pour leur conversion en acétyl-CoA par la β -oxydation. L'activité de LAL n'a pas été affectée par le BPC126 chez les animaux sédentaires, mais a diminué de façon significative après l'entraînement chez les animaux exposés au BPC126 (Figure 3.2C). Cela suggère que, suite à l'entraînement, les hépatocytes exposés au BPC126 ont une capacité réduite à l'hydrolyse lipidique dans leurs lysosomes. En somme, tous ces résultats indiquent que l'autophagie n'est pas impliquée dans l'augmentation du contenu lipidique hépatique induit par le BPC126, et cet effet ne peut pas être inversé par l'entraînement.

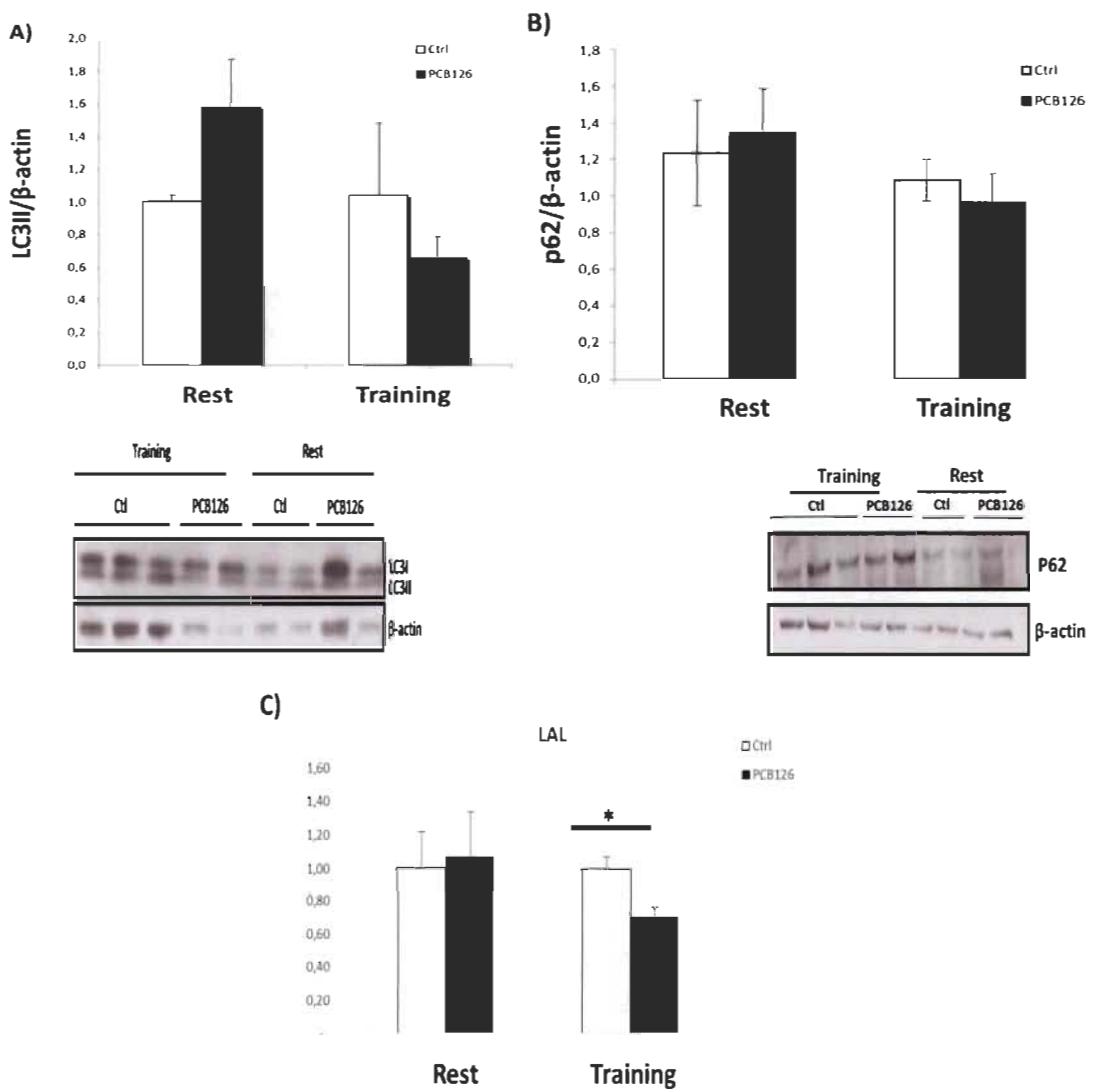


Figure 3.2

L'entraînement et le BPC126 altèrent l'activité lysosomale.

(A-B) L'expression de marqueurs autophagiques n'est pas affectée par le BPC126. L'expression de LC3II (A) et p62 (B) a été évaluée par Western blot et quantifiée en à l'aide d'ImageJ en utilisant l'actine comme contrôle. (C) L'activité de la LAL diminue suite au BPC126 et entraînement. L'activité de la LAL a été mesurée dans des extraits de foie de rats ayant subi les traitements indiqués dans la figure à l'aide d'un kit enzymatique. Les barres sont les erreurs standard; * p < 0,05. L'analyse statistique a été effectuée avec One way ANOVA, Ctrl repos et BPC126 repos : n=4, Ctrl entraînement et entraînement et BPC126 n=5). L'analyse statistique a été effectuée avec One way ANOVA, Ctrl repos et BPC126 repos : n=4, Ctrl entraînement et entraînement et BPC126 n=5).

3.3 L'entraînement prévient l'accumulation de lipides dans le foie en augmentant la β -oxydation

Bien que le nombre de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes et la quantité de protéine FABP1 n'aient pas diminué en réponse à l'entraînement chez les rats exposés au BPC126, la taille des gouttelettes lipidiques dans les mêmes conditions a diminué (Figure 3.1C). Ces résultats suggèrent que bien que l'entraînement n'ait pas réduit le nombre de gouttelettes lipidiques chez les rats exposés au BPC126, il affecte néanmoins le métabolisme lipidique. Comme les AGs peuvent être libérés des gouttelettes lipidiques par des lipases cytoplasmiques ou par contact direct avec les mitochondries ou les peroxysomes indépendamment de l'autophagie, nous avons déterminé alors si l'entraînement a affecté la fonction de ces organelles par la β -oxydation.

PGC1 α est un co-activateur transcriptionnel qui promeut la biogénèse mitochondriale et peroxisomale en réponse à différentes conditions où l'initiation de la β -oxydation est exigée, en incluant l'exercice (Santos *et al.* 2014). Nous avons mesuré ainsi les niveaux de PGC1 α hépatique en réponse à l'entraînement et à l'exposition au BPC126. Les résultats montrent que suite au traitement au BPC126 la protéine PGC1 α est augmentée chez les rats au repos uniquement. Ceci suggère que la première réponse au stress induit par le BPC126 est la prolifération et l'augmentation de la fonction mitochondriale pour essayer de contrer l'effet du BPC126 (Figure 3.3A). Afin de déterminer si l'augmentation des niveaux PGC1 α avait pour résultat une réelle augmentation de la biogénèse mitochondriale, nous avons mesuré le niveau d'une protéine mitochondriale structurale mtHSP70 (Wadhwa *et al.* 2002). L'ajout du BPC126 chez les rats entraînés augmente significativement la quantité de mtHSP70 par rapport aux rats exposés au BPC126, mais qui n'ont pas été entraînés. L'entraînement peut être en mesure de prévenir le dysfonctionnement de la structure des mitochondries provoqué éventuellement par l'ajout du BPC126 (Figure 3.3B). Cependant, malgré une augmentation semblable de PGC1 α chez les rats traités au BPC126 et au repos, l'augmentation du marqueur mitochondrial a été restreinte aux animaux exposés au BPC126 et entraînés (Figure 3.3A). Ces résultats indiquent que l'ajout du BPC126

semble être en mesure d'affecter la structure des mitochondries, mais l'entraînement prévient ce dysfonctionnement.

En plus de la biogenèse mitochondriale, PGC1 α stimule la biogenèse peroxysomale. Par ailleurs, il est connu que les BPCs diminuent la fonction peroxysomale, nous avons déterminé l'effet de l'entraînement sur les peroxysomes chez les rats traités au BPC126. En accord avec l'accumulation de lipides provoqués par le BPC126, l'exposition au BPC126 a réduit radicalement la quantité de PMP70, une protéine peroxysomale faisant partie des transporteurs membranaires ABC et impliquée dans le transport des AGs à longues chaînes à l'intérieur des peroxysomes pour la β -oxydation (Sakaue *et al.* 2016). PMP70 est diminuée chez les rats traités au BPC126, mais augmentée avec l'entraînement (Figure 3.3D). PEX19 est une peroxyne nécessaire à la division, renouvellement l'assemblage et la prolifération des peroxysomes et donc à la biogenèse (Agrawal *et al.* 2017). D'après les résultats la structure des peroxysomes ne semble pas être affectée par aucune condition (Figure 3.3C). Cela suggère que le BPC126 affecte le fonctionnement des peroxysomes et l'entraînement contrecarre ce dysfonctionnement. En résumé le BPC126 n'affecte pas la biogenèse des peroxysomes, mais leur fonctionnement et l'entraînement rétablit cet effet. Néanmoins, l'entraînement a incité une augmentation importante de PMP70 chez les rats traités au BPC126, en maintenant des niveaux similaires de PEX19. Au final, ces résultats suggèrent bien que l'entraînement ne prévient pas l'accumulation des gouttelettes lipidiques chez les rats exposés au BPC126, mais il augmente la β -oxydation et réduit ainsi l'accumulation de lipidiques dans le foie.

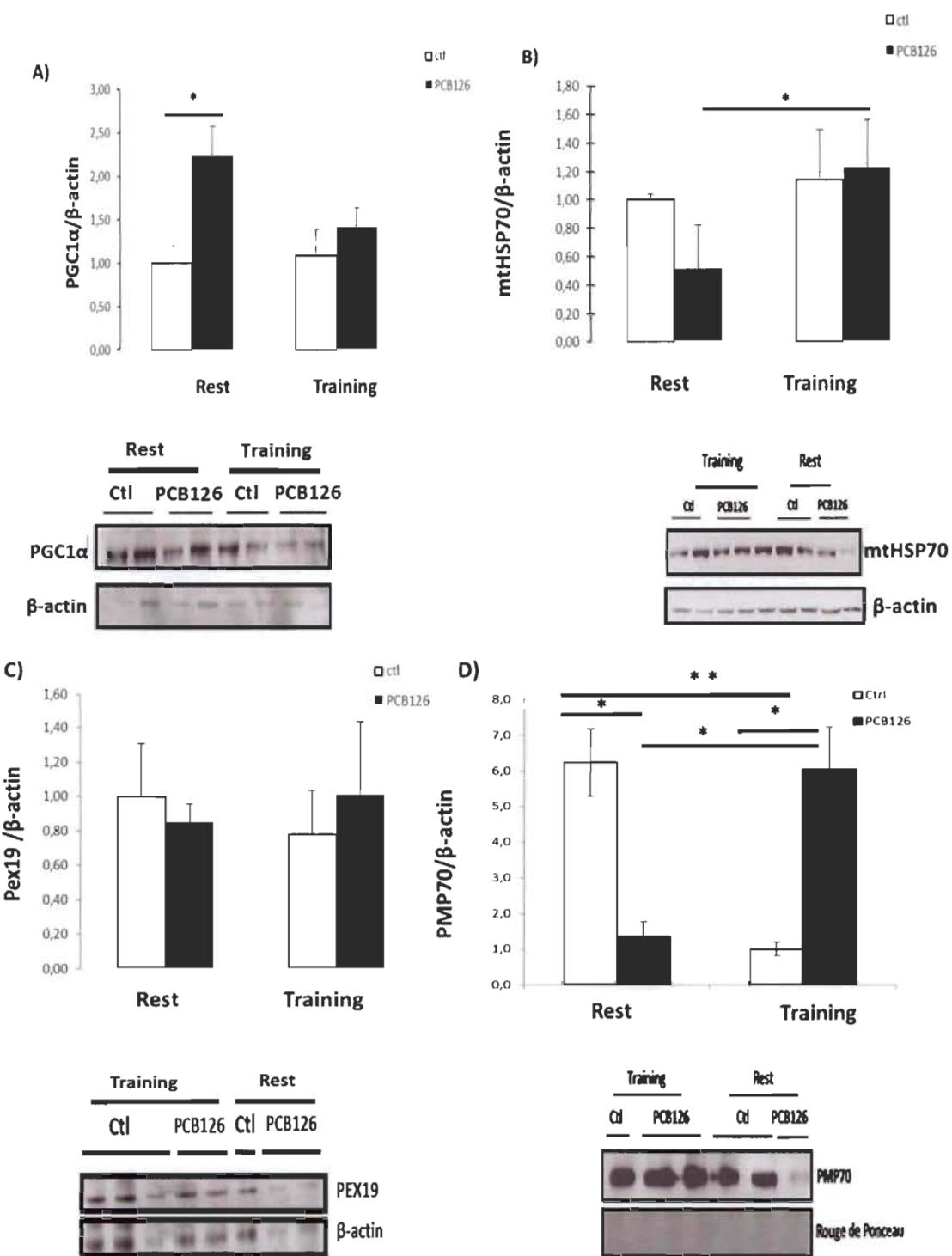


Figure 3.3 L’entraînement améliore la biogénèse mitochondriale et peroxisomale. L’expression de PGC1 α (biogénèse mitochondriale; A), mtHSP70 (marqueur mitochondrial; B), PEX19 et PMP70 (marqueurs peroxisomiaux; C et D) a été mesuré par western blot. La quantification a

été effectuée à l'aide d'ImageJ. Les barres sont les erreurs standard; * $p < 0.05$. L'analyse statistique a été effectuée avec One-way ANOVA, Ctl repos et BPC126 repos : n=4, Ctl entraînement et entraînement et BPC126 n=5.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Les BPCs suscitent l'intérêt des chercheurs suite à leur détection dans l'environnement, notamment quand des cas de perturbations métaboliques et hormonales ont été rapportés (Jiang *et al.* 2016, Wu *et al.* 2017). De ce fait, les études sur les BPCs se sont multipliées afin de caractériser l'impact de leurs toxicités sur l'organisme (Robertson *et al.* 2007, Vorrink *et al.* 2014, Loiola *et al.* 2016). Parmi les désordres métaboliques provoqués suite à une exposition aux BPCs, l'accumulation de lipides hépatiques est de loin la plus importante (Haddad *et al.* 2000). En effet, l'accumulation de lipides dans le foie peut évoluer en SHNA, qui est un stade plus avancé (Feaver *et al.* 2016). Jusqu'à aujourd'hui, il n'y a pas encore de traitements pour cette pathologie complexe à l'exception du traitement symptomatique. Par contre, quelques études ont démontré l'entraînement comme traitement potentiel de la SHNA (Park *et al.* 1995, Hickman *et al.* 2004). En se basant sur ces résultats, l'hypothèse de ce travail a été bâtie. Durant ce projet, nous avons démontré que l'entraînement atténueait l'augmentation de la taille des gouttelettes lipidiques hépatiques engendrée par une exposition aux BPCs. Ces résultats démontrent pour la première fois les mécanismes impliqués dans la réduction de la taille des vésicules lipidiques suite à l'entraînement, par conséquent l'atténuation de l'effet du BPC. Pour ce projet, il était important de prédisposer le métabolisme hépatique à développer une SHNA. Pour ceci, nous avons donc induit une accumulation de lipides hépatiques en exposant des rats au BPC126 (Lai *et al.* 2012). Le BPC126 cause une augmentation du nombre des vésicules lipidiques hépatiques (Lai *et al.* 2010, Lai *et al.* 2011), mais également diverses altérations incluant un dysfonctionnement du potentiel redox hépatique, une altération des taux des enzymes antioxydantes ainsi qu'une perturbation de l'homéostasie des métaux (Lai *et al.* 2011).

Étant donné que les recherches ont commencé à confirmer le rôle de l'entraînement en endurance dans le développement de la SHNA comme traitement

potentiel et à confirmer son effet réducteur des lipides intra-hépatiques et du tissu adipeux (Johnson *et al.* 2009, Hallsworth *et al.* 2011), nous avons donc étudié l'effet de l'entraînement sur l'accumulation lipidique engendrée par le BPC. Suite à la quantification des vésicules lipidiques, nous avons effectivement montré une augmentation de la taille des vésicules lipidiques après une exposition au BPC126 (Figure 3.1C et D). Toutefois, l'entraînement ne semble pas diminuer le nombre de vésicules lipidiques, mais diminue significativement leur taille (Figure 3.1A, B et C). L'étude du marqueur responsable du transport lipidique, FABP1, a montré une augmentation suite au traitement au BPC126 chez les rats entraînés, ce qui implique qu'en réponse à l'effet du BPC126, le métabolisme essaie de contrecarrer en éliminant l'excès de lipides. Effectivement, FABP1 transporte les AGs vers différents compartiments cellulaires notamment aux mitochondries/peroxysomes pour leur oxydation (Furuhashi *et al.* 2008).

PPAR α est une protéine impliquée dans la captation des AGs par les cellules et également responsable de leur dégradation en régulant l'expression de nombreux gènes responsables du métabolisme des AGs (Chawla *et al.* 2001). De plus, PPAR α module l'expression de gènes impliqués dans le transport des AGs et des enzymes de modifications des AGs permettant leur entrée dans les mitochondries/peroxisomes pour y être oxydés (Pyper *et al.* 2010). Son expression n'est ni affectée par l'entraînement ni par le BPC126. Ceci ne corrèle pas avec l'augmentation de la taille des vésicules lipidiques ainsi que l'augmentation de FABP1 chez les rats entraînés et traités au BPC126, (Figure 3.1D et E). À ce niveau, nous ne pouvons ni confirmer ni infirmer l'implication de PPAR α . En effet, PPAR α joue un rôle primordial dans le métabolisme lipidique en régulant différents gènes hépatiques impliqués dans l'utilisation d'AGs, le transport intracellulaire, l'activation des AGs en acyl-CoA ainsi que la β -oxydation mitochondriale/peroxisomale (Han *et al.* 2017). En outre, PPAR α régule les enzymes acyl-CoA synthétase et carnitine palmitoyl transferase-1, qui sont essentielles pour la production d'acyl-CoA et facilitent respectivement leur entrée aux mitochondries (Coleman *et al.* 2002). Le premier lien établit entre PPAR α et le catabolisme des acides gras était l'identification du gène de l'acyl-CoA oxydase qui est l'enzyme limitante dans

l’oxydation des acides gras à très longues chaînes comme son gène cible (Rakhshandehroo *et al.* 2010). Pour cette raison, la présence de la protéine PPAR α ne nous permet pas de conclure sur son activation, pour cela, il faudra investiguer ses gènes cibles ainsi que l’expression de son ARNm. Afin de tenter d’expliquer les mécanismes responsables de la diminution de la taille des vésicules lipidiques, nous nous sommes orientés vers l’autophagie comme un mécanisme potentiel. L’autophagie est un processus qui catabolise les composantes cellulaires, comme les organelles endommagées, les pathogènes intracellulaires et les protéines non repliées en les acheminant vers les lysosomes pour leur dégradation (Finn *et al.* 2006, Zamani *et al.* 2016). L’inhibition ou la diminution de l’autophagie induit une augmentation de triglycérides dans les vésicules lipidiques ainsi qu’une diminution de leur catabolisme *in vivo* et *in vitro* (Singh *et al.* 2009). Au contraire, une augmentation anormale des vésicules lipidiques hépatiques engendre une perturbation du mécanisme autophagique en diminuant la colocalisation des lysosomes avec les triglycérides, ainsi qu’une diminution de l’association des autophagosomes avec les vésicules lipidiques (Singh *et al.* 2009, Koga *et al.* 2010). De ces résultats, l’implication de l’autophagie dans la régulation du métabolisme lipidique hépatique a été déterminée (Singh *et al.* 2009). Toutefois, l’inhibition du mécanisme autophagique dans le tissu adipeux induit une diminution de la taille et le nombre des adipocytes (Bell *et al.* 2000, Polak *et al.* 2008). La diminution de la taille des adipocytes est due à la régression du contenu lipidique stocké suite au blocage de la différenciation de ces cellules. En somme, un mécanisme autophagique intact prévient la lipotoxicité dans le foie et un stockage de lipides optimal dans les adipocytes (Singh *et al.* 2009).

Néanmoins, le rôle de l’autophagie demeure contexte – dépendant. Il a été démontré que l’autophagie dans certaines pathologies joue un rôle protecteur et dans d’autres, favorise la toxicité (Grosso *et al.* 2017). En effet, plusieurs études se sont intéressées au rôle de l’autophagie dans le développement de la SHNA et donc dans le métabolisme lipidique (Ding *et al.* 2010, Zhang *et al.* 2017). Une étude a rapporté que l’autophagie régule le métabolisme lipidique en éliminant les triglycérides et prévient le développement de la SHNA. Ce groupe a montré que l’inhibition de l’autophagie en

inactivant Atg5, un gène responsable de l'elongation de l'autophagosome, dans des hépatocytes en culture, résultait en une augmentation des triglycérides hépatiques (Singh *et al.* 2009), et ceci en présence et en absence d'apport exogène de lipides. Une colocalisation des vésicules lipidiques avec la protéine LC3II par immunofluorescence a également été établie (Lavallard *et al.* 2014). De plus, une brève exposition des blastocystes aux BPCs engendre un dysfonctionnement du processus autophagique. Cette dérégulation mène à une altération morphologique et fonctionnelle aboutissant à une mort cellulaire (Klionsky 2007, Ptak *et al.* 2012). Cependant, une forte dose de BPC entraîne la mort des cellules autophagiques, ce qui implique que l'autophagie a un rôle cytoprotecteur dans les premiers stades de toxicité (Ptak *et al.* 2012, Shi *et al.* 2016).

Nos résultats ne concordent pas avec l'effet cytoprotecteur attendu. Certes, l'injection du BPC126 réussit à augmenter la quantité de lipides, mais la dose administrée n'est pas assez élevée pour induire l'autophagie, ce qui corrobore l'augmentation non significative du nombre de vésicules lipidiques. De plus, il a été montré que l'entraînement induit l'autophagie dans plusieurs organes comme le muscle, le foie, le pancréas et le tissu adipeux (He *et al.* 2012). En revanche, nous avons constaté que l'entraînement seul ou en combinaison avec le BPC126 ne montre pas un changement autophagique dans le foie. En vue de mieux comprendre ces observations, nous avons vérifié l'activité des lysosomes en mesurant une enzyme lysosomale (LAL) spécifique à la dégradation des triglycérides et l'ester cholestéryl (Desai *et al.* 2000, Chora *et al.* 2017). De plus, une déficience de l'activité de l'enzyme LAL a été décrite chez des patients ayant la SHNA, ce qui suggère qu'un dysfonctionnement de LAL peut contribuer à l'accumulation lipidique intracellulaire (Reiner *et al.* 2014, Vespasiani-Gentilucci *et al.* 2016).

L'étude des lysosomes a montré leur implication dans l'élimination de l'accumulation lipidique (Reiner *et al.* 2014, Mehta *et al.* 2016, Vespasiani-Gentilucci *et al.* 2016). En effet, l'inhibition des lysosomes engendre l'accumulation des triglycérides et du cholestérol, augmentant l'accumulation des lipides et la colocalisation des

vésicules lipidiques avec le marqueur lysosomal LAMP1 (Singh *et al.* 2009, Zamani *et al.* 2016). Cependant, suite à l'injection du BPC126, l'activité du LAL n'est pas affectée. Par contre, son activité diminue chez les rats exposés au BPC126 et entraînés (Figure 3.2C). Cette diminution de l'activité de LAL pourrait expliquer l'augmentation du nombre des vésicules lipidiques et l'inactivation de la voie autophagique dans la même condition. En somme, tous ces résultats suggèrent que la voie autophagique n'est pas impliquée dans la réduction de la taille des gouttelettes lipidiques. Par conséquent, la β -oxydation, un processus en aval de l'autophagie a été investigué (Chen *et al.* 2017) qui pourrait éventuellement expliquer la réduction de la taille des vésicules lipidiques. La β -oxydation des acides gras est un processus catabolique composé de plusieurs étapes se déroulant dans les mitochondries et peroxysomes afin de dégrader les acides gras pour produire de l'énergie (Lopaschuk *et al.* 2010).

Il est connu que certaines situations physiologiques requièrent une adaptation du métabolisme mitochondrial dans les tissus sollicités, comme la naissance, le froid et l'activité physique (Herbst *et al.* 2016, Chen *et al.* 2017, Zhang *et al.* 2017). Ces changements se caractérisent par l'augmentation de la biogenèse mitochondriale qui s'accompagne par une synthèse accrue d'ATP. La biogenèse mitochondriale est régulée par la protéine PGC1 α qui a été identifiée comme un régulateur clé du métabolisme énergétique (Yoon *et al.* 2001) en raison de sa capacité à co-activer plusieurs facteurs de transcriptions de gènes mitochondriaux et ceci a été confirmé par l'observation d'une augmentation de la translocation de PGC1 α au noyau, coïncidant avec l'augmentation de l'expression de gènes mitochondriaux (Louet *et al.* 2002). De même, elle est impliquée indirectement dans la régulation de la transcription de l'ADN mitochondrial (mtADN) en augmentant l'expression du facteur de transcription mitochondrial Tfam, nécessaire à la transcription et au maintien de l'ADN mitochondrial (Hallberg *et al.* 2011). Par ailleurs, PGC1 α stimule la transcription de l'enzyme limitante de l'oxydation de longues chaînes d'AGs, CPT-1 (Louet *et al.* 2002, Leone *et al.* 2005). De cette manière, PGC1 α agit comme un régulateur central de la réponse adaptative à l'exercice en coordonnant l'expression de gènes mitochondriaux (Radak *et al.* 2002). En effet, il a été observé que l'entraînement s'accompagne d'une augmentation de l'activité des enzymes

antioxydantes, une diminution du stress oxydatif et une augmentation du transfert des électrons des enzymes mitochondriaux dans le foie, le cerveau le cœur et le rein (Navarro *et al.* 2004). Au contraire, une déficience du gène de PGC1 α engendre une diminution de la capacité de l'activité physique, un contrôle du poids anormal et une apparition de SHNA (Leone *et al.* 2005). Afin de vérifier l'effet du BPC126 et de l'entraînement sur la capacité oxydative, nous avons évalué l'expression de la protéine PGC1 α . Étonnement, l'entraînement seul ou en combinaison avec le BPC126 n'affecte pas l'expression de PGC1 α . Par contre, PGC1 α est augmentée suite à l'exposition au BPC126 chez les rats au repos, ce qui suggère que le BPC126 semble engendrer une réponse au stress induit (Figure 3.3A). Comme défini ci-dessus, PGC1 α est localisée dans le noyau cellulaire et active des facteurs de transcriptions nucléaires qui ciblent des gènes impliqués dans la chaîne respiratoire comme la β -synthétase, CoxIV/II, cytochrome C et aussi Tfam. Donc, PGC1 α est responsable de la prolifération des mitochondries ainsi que de leur fonction. Par conséquent, elle augmente la densité mitochondriale (Wu *et al.* 1999). De ces résultats, il est conclu que le BPC126 déclenche la fonction mitochondriale pour contrer la toxicité induite. Afin de confirmer ces résultats, nous avons regardé l'état des mitochondries en évaluant l'expression d'une protéine structurale mitochondriale mtHSP70 (Figure 3.3B) (Fox 2012, Babot *et al.* 2014). L'expression de mtHSP70 n'est pas consistante avec l'augmentation de PGC1 α observée chez les rats traités et au repos. Par contre, son expression augmente avec l'entraînement chez les rats traités au BPC126. mtHSP70 est une protéine structurale de la mitochondrie localisée dans la matrice mitochondriale et favorise le repliement des protéines (Okamoto *et al.* 2002). Les pré-protéines mitochondrielles sont synthétisées dans le cytosol des ribosomes. Une fois acheminés aux mitochondries, ces précurseurs polypeptidiques doivent être transloqués à la membrane mitochondriale interne via la liaison à la mtHSP70 qui se trouve dans la matrice mitochondriale (Blamowska *et al.* 2012). Mais aussi, le rôle de mtHSP70 a été démontré être impliqué dans le maintien de la morphologie des mitochondries (Burbulla *et al.* 2010, Lee *et al.* 2015). Effectivement, un dysfonctionnement dans mtHSP70 agit sur une protéine de fusion des mitochondries OPA1_L (Optic Atrophy 1 Long Isoform), ce qui engendre la fragmentation des mitochondries (Lee *et al.* 2015). En somme les résultats, affirment que l'entraînement

améliore la capacité oxydative en augmentant la biogenèse mitochondriale par le maintien de la morphologie des mitochondries.

L'augmentation de la biogenèse mitochondriale et de l'expression du marqueur mitochondrial provoquée par l'entraînement nous a conduits à évaluer l'état des peroxysomes par l'expression de marqueurs spécifiques, d'autant plus que les BPCs sont connus pour inhiber l'activité de la β -oxydation peroxysomale en agissant sur l'activité des enzymes comme la catalase, acyl-CoA oxidase, diminuant ainsi la capacité hépatique à cataboliser les AGs (Ariyoshi *et al.* 1998, Robertson *et al.* 2007). Il a été montré qu'une déficience dans les gènes peroxysomaux engendre une interruption de l'elongation des peroxysomes et une perturbation de l'oxydation des AGs, contribuant ainsi à l'accumulation de lipides hépatiques (Weng *et al.* 2013). Depuis longtemps, des études ont investigué l'effet des POPs en dose dépendante sur les peroxysomes (Hansell *et al.* 1974, Mustonen *et al.* 1989). Il a été montré qu'une administration de 50 mg/kg de différents BPCs quotidienne pendant trois jours a engendré une augmentation du nombre des peroxysomes hépatiques par une approche morphologique (Hansell *et al.* 1974). Cependant, une injection de doses de TCDD entre 0,05-5 μ g/kg une fois par semaine pendant deux semaines ne provoque pas de changements significatifs dans le nombre, la taille, la morphologie et l'activité enzymatique peroxysomale (Mustonen *et al.* 1989). De la même manière, un changement dans la β -oxydation peroxysomale ainsi qu'un changement dans la morphologie des peroxysomes n'ont pas été notés suite à une dose de 5mg/kg de BPC77 et de différentes doses entre 0,1-100 ppb de BPC126 respectivement (Borlakoglu *et al.* 1993, MacLellan *et al.* 1994). En conclusion, il semble qu'une faible dose de TCDD ou une dose non toxique de BPCs n'a aucun effet sur l'activité peroxysomale. Par contre, plusieurs études ont démontré qu'une forte dose de BPC126 induit la toxicité en diminuant l'activité des peroxysomes en inhibant l'activité de l'enzyme acyl-CoA oxydase peroxysomale, l'enzyme initiale et limitante de la β -oxydation peroxysomale (Robertson *et al.* 2007, Glauert *et al.* 2008, Gadupudi *et al.* 2016). Ces observations sont consistantes avec les résultats engendrés par une administration d'une dose de 160 μ g/kg de TCDD. En effet, à cette dose il y a aussi une diminution de l'enzyme acyl-CoA oxydase (Ariyoshi *et al.* 1998).

Dans la même optique, nous avons regardé si les peroxysomes étaient affectés par le BPC126. Pour ce faire, nous avons mesuré l'expression de la peroxyne, PEX19, une protéine responsable de l'assemblage et la division des peroxysomes (Agrawal *et al.* 2017). Pex19 est localisée dans la membrane peroxysomale et dans le cytosol, elle est donc capable d'interagir avec la majorité des protéines peroxysomales membranaires (PMPs) et d'être ainsi un récepteur d'import soluble pour les protéines nouvellement synthétisées (Rucktaschel *et al.* 2011). PEX19 lie les protéines membranaires dans le cytosol, les dirige à la membrane peroxysomale et les stabilise en formant un complexe soluble, ce qui prévient l'agrégation des PMPs (Emmanouilidis *et al.* 2017). Finalement, cette peroxyne agit comme un facteur d'intersection durant l'import des PMPs ou fonctionne également comme un facteur d'assemblage et de désassemblage des complexes peroxysomaux membranaires (Rucktaschel *et al.* 2011, Agrawal *et al.* 2017, Emmanouilidis *et al.* 2017). Les résultats de ce travail n'ont montré aucun changement dans l'expression de PEX19 (Figure 3.3C), ce qui propose que ni l'entraînement ni le BPC126 n'affecte la structure des peroxysomes. Afin d'identifier les mécanismes responsables, nous avons mesuré l'expression de la protéine PMP70. Cette protéine fait partie de la famille des protéines de transport, cette famille de transporteurs est appelée ABC (ATP-Binding-Cassette) et réside à la membrane peroxysomale (Mosser *et al.* 1993). PMP70 assure le transport des AGs à longues chaînes et des branches d'acyl-CoA du cytosol vers le lumen du peroxysome pour la β -oxydation (Kamijo *et al.* 1990, van Roermund *et al.* 2008, Hillebrand *et al.* 2012). Nos résultats ont montré que l'expression de PMP70 est diminuée suite à l'exposition au BPC126. (Figure 3.3D). Par la suite, nous avons regardé si l'entraînement confirme son effet stimulant de la β -oxydation. En effet, l'expression du marqueur peroxysomal a augmenté significativement suite à l'entraînement chez les rats exposés au BPC126, ce qui corrobore les résultats du marqueur mitochondrial mtHSP70. En somme, suite à l'accumulation de lipides par le BPC126, les mitochondries répondent au stress induit en augmentant leur biogénèse. Parallèlement, le BPC126 engendre une altération de la fonction des peroxysomes en diminuant PMP70. Cependant, l'évaluation de l'expression des protéines mtHSP70 et PEX19 suggère que le BPC126 ne semble ni affecter les mitochondries ni les peroxysomes au niveau structural. L'entraînement contrecarre

l'augmentation de lipides induite par les BPC126 en augmentant la fonction peroxysomale et favorise un maintien structural des mitochondries.

Ces résultats nous ont permis d'établir un modèle schématisant l'effet du BPC126 sur les hépatocytes ainsi que le mécanisme impliqué dans l'atténuation de lipides par l'entraînement suite à une exposition au BPC126 (Figures 4.1 et 4.2).

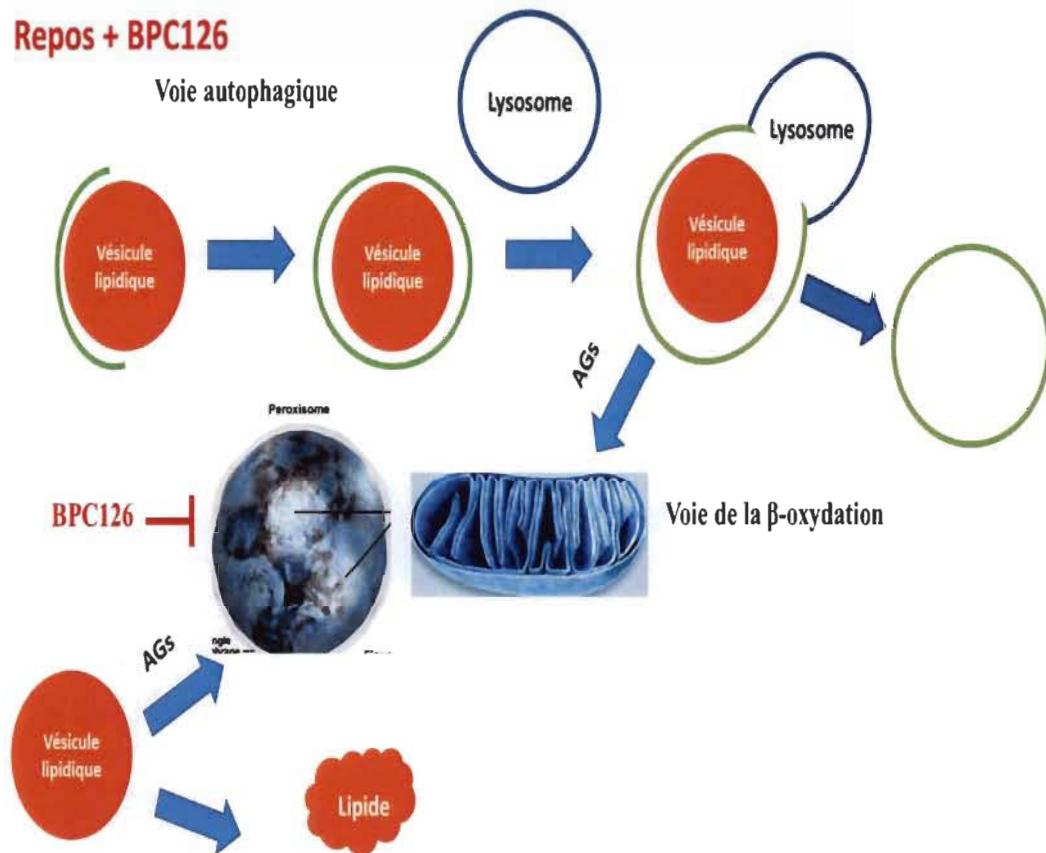


Figure 4.1 Schéma synthétisant l'effet du BPC126 sur les hépatocytes.
 Ce modèle résume l'effet d'une dose de BPC126 sur le foie de rats sédentaires. L'analyse de coupes d'hépatocytes colorées à l'Oil Red O montre une accumulation de lipides ainsi qu'une augmentation de la taille des vésicules lipidiques. Cette accumulation a été en partie expliquée par le blocage de la voie de la β -oxydation. Ceci a été évalué par l'analyse du marqueur peroxysomal (PMP70).

Entraînement + BPC126

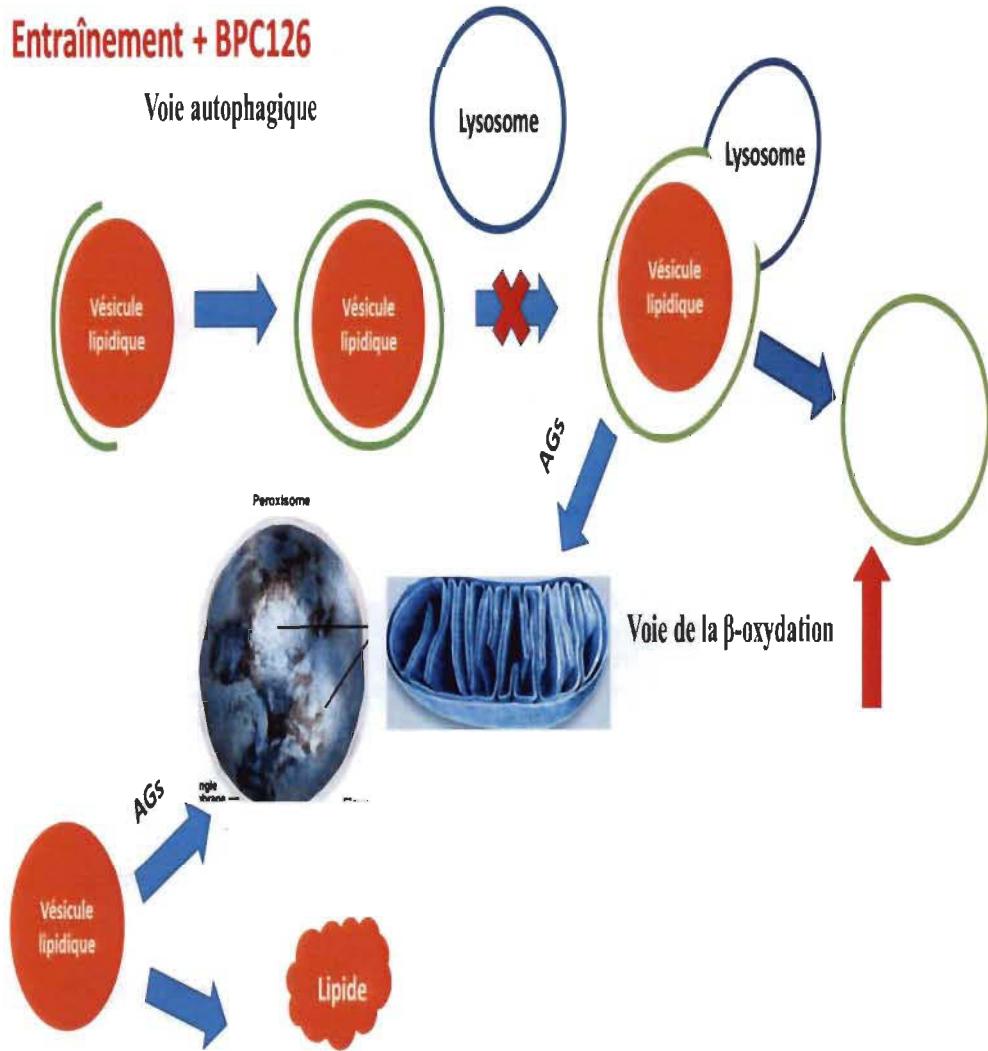


Figure 4.2 Schéma du mécanisme potentiel impliqué dans l'atténuation des lipides suite à l'entraînement.

Ce modèle résume les résultats obtenus. En effet, ce travail a montré que l'entraînement ne diminue pas la taille des vésicules lipidiques en empruntant la voie autophagique escomptée par la mesure des marqueurs spécifiques autophagiques, LC3 et P62. Par contre, l'entraînement stimule la β-oxydation en favorisant la fonction mitochondriale/peroxysomale en réponse au blocage des fonctions peroxysomales induite par le BPC126. Cette fonction a été déterminée par les marqueurs peroxysomaux et mitochondriaux, mtHSP70 et PMP70.

CHAPITRE V

CONCLUSION

En conclusion, les résultats de ce travail donnent un aperçu du mécanisme complexe par lequel l'entraînement pourrait atténuer les effets lipotoxiques engendrés par le BPC126 sur le foie et ainsi ouvrir la porte à d'intéressantes hypothèses sur les mécanismes d'action. Nous n'avons pas déterminé le mécanisme exact par lequel l'entraînement atténue la taille des vésicules lipidiques, mais nous avons réussi à exclure l'implication de l'autophagie et mettre en évidence le rôle important que joue la β oxydation. Il serait important d'investiguer plus en profondeur l'effet du BPC126 sur la β -oxydation en mesurant l'activité enzymatique des peroxysomes comme l'acyl-CoA oxydase et en particulier les gènes cibles de PPAR α et des mitochondries. Par ailleurs, la réduction de la taille des vésicules lipidiques sans diminuer leur nombre nous indique qu'un phénomène de « succion » pourrait être impliqué. En effet, il semblerait que les vésicules lipidiques ne soient pas dégradées entièrement, mais que leur contenu serait réduit. Donc, en perspective, ce projet pourrait être approfondi en poursuivant l'étude des mécanismes impliqués dans la diminution de la taille des vésicules lipidiques en s'attardant sur l'activité des lipases. Il serait intéressant d'étudier notamment les lipases hormono-sensibles (HSL) dans les adipocytes. Ces HSL agissent sous l'effet d'hormones tel que le glucagon qui activent la voie de l'AMPc. Suite à l'activation de l'adénylate cyclase qui produit de l'AMPc. Cette dernière active la kinase PKA qui active l'HSL en la phosphorylant (Mersmann, 1998). Il serait important également, d'évaluer l'activité de l'enzyme triacylglycérol hydrolase (TGH) qui est fortement exprimée dans le foie et est responsable de la dégradation des triglycérides. Il serait pertinent aussi de mesurer l'activité de l'enzyme adipose triglyceride lipase (ATGL), responsable de la dégradation du triacylglycerol (TAG), ainsi que de doser l'activité de l'enzyme limitante de l'initiation de la lipolyse (Choi, Kim *et al.*, 2016).

L'évaluation de l'activité de ces lipases sous l'effet du BPC et de l'entraînement serait fondamentale pour élucider plus précisément les mécanismes responsables de la diminution de la taille des vésicules lipidiques. Aussi, il serait judicieux d'induire une accumulation lipidique par injection de BPC126 et par la suite procéder à l'entraînement pour déterminer si l'entraînement pourrait renverser l'effet toxique déjà établi. Finalement, il serait important de revoir le mode d'injection des BPC pour procéder à des injections chroniques afin de reconduire plus précisément la réalité de la toxicité. Toutes les informations recueillies seront nécessaires, d'une part pour atteindre une meilleure compréhension de la perturbation du métabolisme lipidique engendrée par une exposition aux BPCs et d'autre part, pour identifier le mécanisme d'action impliqué par lequel l'entraînement atténue l'accumulation lipidique hépatique, ce qui pourrait guider l'utilisation de l'entraînement comme traitement potentiel des pathologies hépatiques telles que la SHNA.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abeliovich, H., W. A. Dunn, Jr., J. Kim and D. J. Klionsky (2000). "Dissection of autophagosome biogenesis into distinct nucleation and expansion steps." J Cell Biol **151**(5): 1025-1034.
- Aggoun, Y. (2007). "Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease." Pediatr Res **61**(6): 653-659.
- Agrawal, G., H. H. Shang, Z. J. Xia and S. Subramani (2017). "Functional regions of the peroxin Pex19 necessary for peroxisome biogenesis." J Biol Chem.
- Aleksandrova, K., M. Stelmach-Mardas and S. Schlesinger (2016). "Obesity and Liver Cancer." Recent Results Cancer Res **208**: 177-198.
- Alex, S., A. Boss, A. Heerschap and S. Kersten (2015). "Exercise training improves liver steatosis in mice." Nutr Metab (Lond) **12**: 29.
- Alexander, D. L., L. G. Ganem, P. Fernandez-Salguero, F. Gonzalez and C. R. Jefcoate (1998). "Aryl-hydrocarbon receptor is an inhibitory regulator of lipid synthesis and of commitment to adipogenesis." J Cell Sci **111** (Pt 22): 3311-3322.
- Angrish, M. M., B. D. Mets, A. D. Jones and T. R. Zacharewski (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 **128**(2): 377-386.
- Ariyoshi, N., M. Iwasaki, H. Kato, S. Tsusaki, M. Hamamura, T. Ichiki and K. Oguri (1998). "Highly toxic coplanar PCB126 reduces liver peroxisomal enzyme activities in rats." Environ Toxicol Pharmacol **5**(3): 219-225.
- Artacho-Cordon, F., J. Leon, J. M. Saenz, M. F. Fernandez, P. Martin-Olmedo, N. Olea and J. P. Arrebola (2016). "Contribution of Persistent Organic Pollutant Exposure to the Adipose Tissue Oxidative Microenvironment in an Adult Cohort: A Multipollutant Approach." Environ Sci Technol **50**(24): 13529-13538.
- Atshaves, B. P., G. G. Martin, H. A. Hostetler, A. L. McIntosh, A. B. Kier and F. Schroeder (2010). "Liver fatty acid-binding protein and obesity." J Nutr Biochem **21**(11): 1015-1032.

- Babot, M., A. Birch, P. Labarbuta and A. Galkin (2014). "Characterisation of the active/de-active transition of mitochondrial complex I." *Biochim Biophys Acta* **1837**(7): 1083-1092.
- Banduseela, V. C., Y. W. Chen, H. G. Kultima, H. S. Norman, S. Aare, P. Radell, L. I. Eriksson, E. P. Hoffman and L. Larsson (2013). "Impaired autophagy, chaperone expression, and protein synthesis in response to critical illness interventions in porcine skeletal muscle." *Physiol Genomics* **45**(12): 477-486.
- Barbalace, R. (2003). "The Chemistry of Polychlorinated Biphenyls." EnvironmentalChemistry.com.
- Beischlag, T. V., J. Luis Morales, B. D. Hollingshead and G. H. Perdew (2008). "The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **18**(3): 207-250.
- Bell, A., L. Grunder and A. Sorisky (2000). "Rapamycin inhibits human adipocyte differentiation in primary culture." *Obes Res* **8**(3): 249-254.
- Bergamaschi, E., S. Catalani, G. Folesani, P. Venco, E. Bodini, F. Guidetti, R. Bergonzi, I. Franchini and P. Apostoli (2005). "[Environmental and biological monitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in workers of an electric steel foundry]." *Med Lav* **96**(5): 390-402.
- Bergqvist, N., E. Nyman, G. Cedersund and K. G. Stenkula (2017). "A systems biology analysis connects insulin receptor signaling with glucose transporter translocation in rat adipocytes." *J Biol Chem*.
- Berlanga, A., E. Guiu-Jurado, J. A. Porras and T. Auguet (2014). "Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease." *Clin Exp Gastroenterol* **7**: 221-239.
- Blais, J. M., K. L. Froese, L. E. Kimpe, D. C. Muir, S. Backus, M. Comba and D. W. Schindler (2003). "Assessment and characterization of polychlorinated biphenyls near a hazardous waste incinerator: analysis of vegetation, snow, and sediments." *Environ Toxicol Chem* **22**(1): 126-133.
- Blamowska, M., W. Neupert and K. Hell (2012). "Biogenesis of the mitochondrial Hsp70 chaperone." *J Cell Biol* **199**(1): 125-135.
- Booth, F. W., M. J. Laye, S. J. Lees, R. S. Rector and J. P. Thyfault (2008). "Reduced physical activity and risk of chronic disease: the biology behind the consequences." *Eur J Appl Physiol* **102**(4): 381-390.

- Borlakoglu, J. T., C. J. Henderson and C. R. Wolf (1993). "Lactational transfer of 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl but not 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl, induces neonatal CYP4A1." *Biochem Pharmacol* **45**(3): 769-771.
- Botchlett, R., S. L. Woo, M. Liu, Y. Pei, X. Guo, H. Li and C. Wu (2017). "Nutritional approaches for managing obesity-associated metabolic diseases." *J Endocrinol* **233**(3): R145-R171.
- Boucher, M. P., C. Lefebvre and N. A. Chapados (2015). "The effects of PCB126 on intra-hepatic mechanisms associated with non alcoholic fatty liver disease." *J Diabetes Metab Disord* **14**: 88.
- Brandt, J. M., F. Djouadi and D. P. Kelly (1998). "Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor alpha." *J Biol Chem* **273**(37): 23786-23792.
- Brunt, E. M., D. E. Kleiner, L. A. Wilson, P. Belt, B. A. Neuschwander-Tetri and N. C. R. Network (2011). "Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings." *Hepatology* **53**(3): 810-820.
- Burbulla, L. F., C. Schelling, H. Kato, D. Rapaport, D. Woitalla, C. Schiesling, C. Schulte, M. Sharma, T. Illig, P. Bauer, S. Jung, A. Nordheim, L. Schols, O. Riess and R. Kruger (2010). "Dissecting the role of the mitochondrial chaperone mortalin in Parkinson's disease: functional impact of disease-related variants on mitochondrial homeostasis." *Hum Mol Genet* **19**(22): 4437-4452.
- Bury, N. R., S. Schnell and C. Hogstrand (2014). "Gill cell culture systems as models for aquatic environmental monitoring." *J Exp Biol* **217**(Pt 5): 639-650.
- Carrier, G. and M. Bouchard (2006). "Réévaluation des risques toxicologiques des biphenyls polychlorés." *Institut national de santé publique du Québec*.
- Cave, M., S. Appana, M. Patel, K. C. Falkner, C. J. McClain and G. Brock (2010). "Polychlorinated biphenyls, lead, and mercury are associated with liver disease in American adults: NHANES 2003-2004." *Environ Health Perspect* **118**(12): 1735-1742.
- Chapados, N. A. and M. P. Boucher (2016). "Liver metabolic disruption induced after a single exposure to PCB126 in rats." *Environ Sci Pollut Res Int*.
- Chapados, N. A. and M. P. Boucher (2017). "Liver metabolic disruption induced after a single exposure to PCB126 in rats." *Environ Sci Pollut Res Int* **24**(2): 1854-1861.

- Chawla, A., J. J. Repa, R. M. Evans and D. J. Mangelsdorf (2001). "Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files." Science **294**(5548): 1866-1870.
- Chen, Y. D., Y. T. Fang, C. P. Chang, C. F. Lin, L. J. Hsu, S. R. Wu, Y. C. Chiu, R. Anderson and Y. S. Lin (2017). "S100A10 Regulates ULK1 Localization to ER-Mitochondria Contact Sites in IFN-gamma-Triggered Autophagy." J Mol Biol **429**(1): 142-157.
- Chiari, C. R., R. D. Patel, C. B. Marcus and G. H. Perdew (2007). "Evidence for an aryl hydrocarbon receptor-mediated cytochrome p450 autoregulatory pathway." Mol Pharmacol **72**(5): 1369-1379.
- Chora, J. R., A. C. Alves, A. M. Medeiros, C. Mariano, G. Lobarinhias, A. Guerra, H. Mansilha, H. Cortez-Pinto and M. Bourbon (2017). "Lysosomal acid lipase deficiency: A hidden disease among cohorts of familial hypercholesterolemia?" J Clin Lipidol **11**(2): 477-484 e472.
- Coleman, R. A., T. M. Lewin, C. G. Van Horn and M. R. Gonzalez-Baro (2002). "Do long-chain acyl-CoA synthetases regulate fatty acid entry into synthetic versus degradative pathways?" J Nutr **132**(8): 2123-2126.
- Deenen, M. J., A. Cats, J. H. Beijnen and J. H. Schellens (2011). "Part 2: pharmacogenetic variability in drug transport and phase I anticancer drug metabolism." Oncologist **16**(6): 820-834.
- Desai, N. K. and D. P. Wilson (2000). Lysosomal Acid Lipase Deficiency. Endotext. L. J. De Groot, G. Chrousos, K. Dungan et al. South Dartmouth (MA).
- Diliberto, J. J., D. Burgin and L. S. Birnbaum (1997). "Role of CYP1A2 in hepatic sequestration of dioxin: studies using CYP1A2 knock-out mice." Biochem Biophys Res Commun **236**(2): 431-433.
- Ding, W. X., M. Li, X. Chen, H. M. Ni, C. W. Lin, W. Gao, B. Lu, D. B. Stolz, D. L. Clemens and X. M. Yin (2010). "Autophagy reduces acute ethanol-induced hepatotoxicity and steatosis in mice." Gastroenterology **139**(5): 1740-1752.
- Drover, V. A., M. Ajmal, F. Nassir, N. O. Davidson, A. M. Nauli, D. Sahoo, P. Tso and N. A. Abumrad (2005). "CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood." J Clin Invest **115**(5): 1290-1297.
- Du, J. L., L. P. Cao, Y. J. Liu, R. Jia and G. J. Yin (2016). "A Study of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin Induced Liver Injury in Jian Carp (*Cyprinus carpio* var. *Jian*) Using Precision-Cut Liver Slices." Bull Environ Contam Toxicol **96**(1): 55-61.

- Emmanouilidis, L., U. Schutz, K. Tripsianes, T. Madl, J. Radke, R. Rucktaschel, M. Wilmanns, W. Schliebs, R. Erdmann and M. Sattler (2017). "Allosteric modulation of peroxisomal membrane protein recognition by farnesylation of the peroxisomal import receptor PEX19." Nat Commun **8**: 14635.
- Fattore, E., R. Fanelli, A. Turrini and A. di Domenico (2006). "Current dietary exposure to polychlorodibenzo-p-dioxins, polychlorodibenzofurans, and dioxin-like polychlorobiphenyls in Italy." Mol Nutr Food Res **50**(10): 915-921.
- Feaver, R. E., B. K. Cole, M. J. Lawson, S. A. Hoang, S. Marukian, B. R. Blackman, R. A. Figler, A. J. Sanyal, B. R. Wamhoff and A. Dash (2016). "Development of an in vitro human liver system for interrogating nonalcoholic steatohepatitis." JCI Insight **1**(20): e90954.
- Ferdinandusse, S., S. Denis, E. van Berkel, G. Dacremont and R. J. Wanders (2000). "Peroxisomal fatty acid oxidation disorders and 58 kDa sterol carrier protein X (SCPx). Activity measurements in liver and fibroblasts using a newly developed method." J Lipid Res **41**(3): 336-342.
- Finn, P. F. and J. F. Dice (2006). "Proteolytic and lipolytic responses to starvation." Nutrition **22**(7-8): 830-844.
- Fox, T. D. (2012). "Mitochondrial protein synthesis, import, and assembly." Genetics **192**(4): 1203-1234.
- Furuhashi, M. and G. S. Hotamisligil (2008). "Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets." Nat Rev Drug Discov **7**(6): 489-503.
- Gadupudi, G., F. A. Gourronc, G. Ludewig, L. W. Robertson and A. J. Klingelhutz (2015). "PCB126 inhibits adipogenesis of human preadipocytes." Toxicol In Vitro **29**(1): 132-141.
- Gadupudi, G. S., W. D. Klaren, A. K. Olivier, A. J. Klingelhutz and L. W. Robertson (2016). "PCB126-Induced Disruption in Gluconeogenesis and Fatty Acid Oxidation Precedes Fatty Liver in Male Rats." Toxicol Sci **149**(1): 98-110.
- Gadupudi, G. S., A. J. Klingelhutz and L. W. Robertson (2016). "Diminished Phosphorylation of CREB Is a Key Event in the Dysregulation of Gluconeogenesis and Glycogenolysis in PCB126 Hepatotoxicity." Chem Res Toxicol **29**(9): 1504-1509.

- Glauert, H. P., J. C. Tharappel, Z. Lu, D. Stemm, S. Banerjee, L. S. Chan, E. Y. Lee, H. J. Lehmler, L. W. Robertson and B. T. Spear (2008). "Role of oxidative stress in the promoting activities of pcbs." Environ Toxicol Pharmacol **25**(2): 247-250.
- Glick, D., S. Barth and K. F. Macleod (2010). "Autophagy: cellular and molecular mechanisms." J Pathol **221**(1): 3-12.
- Golabi, P., C. T. Locklear, P. Austin, S. Afdhal, M. Byrns, L. Gerber and Z. M. Younossi (2016). "Effectiveness of exercise in hepatic fat mobilization in non-alcoholic fatty liver disease: Systematic review." World J Gastroenterol **22**(27): 6318-6327.
- Grattagliano, I., O. de Bari, T. C. Bernardo, P. J. Oliveira, D. Q. Wang and P. Portincasa (2012). "Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease--from origin to propagation." Clin Biochem **45**(9): 610-618.
- Grice, B. A., R. G. Nelson, D. E. Williams, W. C. Knowler, C. Mason, R. L. Hanson, K. M. Bullard and M. E. Pavkov (2017). "Associations between persistent organic pollutants, type 2 diabetes, diabetic nephropathy and mortality." Occup Environ Med.
- Grosso, R., C. M. Fader and M. I. Colombo (2017). "Autophagy: A necessary event during erythropoiesis." Blood Rev.
- Guzman, C., M. Benet, S. Pisonero-Vaquero, M. Moya, M. V. Garcia-Mediavilla, M. L. Martinez-Chantar, J. Gonzalez-Gallego, J. V. Castell, S. Sanchez-Campos and R. Jover (2013). "The human liver fatty acid binding protein (FABP1) gene is activated by FOXA1 and PPARalpha; and repressed by C/EBPalpha: Implications in FABP1 down-regulation in nonalcoholic fatty liver disease." Biochim Biophys Acta **1831**(4): 803-818.
- Haddad, S., P. Poulin and K. Krishnan (2000). "Relative lipid content as the sole mechanistic determinant of the adipose tissue:blood partition coefficients of highly lipophilic organic chemicals." Chemosphere **40**(8): 839-843.
- Hallberg, B. M. and N. G. Larsson (2011). "TFAM forces mtDNA to make a U-turn." Nat Struct Mol Biol **18**(11): 1179-1181.
- Halling, J. F., S. Ringholm, J. Olesen, C. Prats and H. Pilegaard (2017). "Exercise training protects against aging-induced mitochondrial fragmentation in mouse skeletal muscle in a PGC-1alpha dependent manner." Exp Gerontol **96**: 1-6.

- Hallsworth, K., G. Fattakhova, K. G. Hollingsworth, C. Thoma, S. Moore, R. Taylor, C. P. Day and M. I. Trenell (2011). "Resistance exercise reduces liver fat and its mediators in non-alcoholic fatty liver disease independent of weight loss." Gut **60**(9): 1278-1283.
- Han, L., W. J. Shen, S. Bittner, F. B. Kraemer and S. Azhar (2017). "PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part I: PPAR-alpha." Future Cardiol **13**(3): 259-278.
- Hansell, M. M. and D. J. Ecobichon (1974). "Effects of chemically pure chlorobiphenyls on the morphology of rat liver." Toxicol Appl Pharmacol **28**(3): 418-427.
- Hardy, T., Q. M. Anstee and C. P. Day (2015). "Nonalcoholic fatty liver disease: new treatments." Curr Opin Gastroenterol **31**(3): 175-183.
- Hazarika, A., H. Kalita, D. Chandra Boruah, M. Chandra Kalita and R. Devi (2016). "Pathophysiology of metabolic syndrome: The onset of natural recovery on withdrawal of a high-carbohydrate, high-fat diet." Nutrition **32**(10): 1081-1091.
- He, C., R. Sumpter, Jr. and B. Levine (2012). "Exercise induces autophagy in peripheral tissues and in the brain." Autophagy **8**(10): 1548-1551.
- Hediger, M. A., M. F. Romero, J. B. Peng, A. Rolfs, H. Takanaga and E. A. Bruford (2004). "The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction." Pflugers Arch **447**(5): 465-468.
- Heilier, J. F., F. Nackers, V. Verougstraete, R. Tonglet, D. Lison and J. Donnez (2005). "Increased dioxin-like compounds in the serum of women with peritoneal endometriosis and deep endometriotic (adenomyotic) nodules." Fertil Steril **84**(2): 305-312.
- Hennig, B., G. Reiterer, M. Toborek, S. V. Matveev, A. Daugherty, E. Smart and L. W. Robertson (2005). "Dietary fat interacts with PCBs to induce changes in lipid metabolism in mice deficient in low-density lipoprotein receptor." Environ Health Perspect **113**(1): 83-87.
- Herbst, E. A. and G. P. Holloway (2016). "Exercise increases mitochondrial glutamate oxidation in the mouse cerebral cortex." Appl Physiol Nutr Metab **41**(7): 799-801.
- Hickman, I. J., J. R. Jonsson, J. B. Prins, S. Ash, D. M. Purdie, A. D. Clouston and E. E. Powell (2004). "Modest weight loss and physical activity in overweight patients with chronic liver disease results in sustained improvements in alanine aminotransferase, fasting insulin, and quality of life." Gut **53**(3): 413-419.

- Hillebrand, M., S. W. Gersting, A. S. Lotz-Havla, A. Schafer, H. Rosewich, O. Valerius, A. C. Muntau and J. Gartner (2012). "Identification of a new fatty acid synthesis-transport machinery at the peroxisomal membrane." *J Biol Chem* **287**(1): 210-221.
- Hiltunen, J. K. and Y. Qin (2000). "beta-oxidation - strategies for the metabolism of a wide variety of acyl-CoA esters." *Biochim Biophys Acta* **1484**(2-3): 117-128.
- Houghton, D., C. Thoma, K. Hallsworth, S. Cassidy, T. Hardy, A. D. Burt, D. Tiniakos, K. G. Hollingsworth, R. Taylor, C. P. Day, S. McPherson, Q. M. Anstee and M. I. Trenell (2017). "Exercise Reduces Liver Lipids and Visceral Adiposity in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis in a Randomized Controlled Trial." *Clin Gastroenterol Hepatol* **15**(1): 96-102 e103.
- Hyotylainen, T. and A. Oikari (2004). "Bioaccumulation of PAHs from creosote-contaminated sediment in a laboratory-exposed freshwater oligochaete, *Lumbriculus variegatus*." *Chemosphere* **57**(2): 159-164.
- Imajo, K., M. Yoneda, T. Kessoku, Y. Ogawa, S. Maeda, Y. Sumida, H. Hyogo, Y. Eguchi, K. Wada and A. Nakajima (2013). "Rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis." *Int J Mol Sci* **14**(11): 21833-21857.
- Jiang, L. G., L. Y. Cheng, S. H. Kong, Y. Yang, Y. J. Shen, C. Chen, X. H. Deng, S. Z. Liu and L. Chao (2016). "Toxic effects of polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254) on human sperm motility." *Asian J Androl*.
- Johnson, N. A., T. Sachinwalla, D. W. Walton, K. Smith, A. Armstrong, M. W. Thompson and J. George (2009). "Aerobic exercise training reduces hepatic and visceral lipids in obese individuals without weight loss." *Hepatology* **50**(4): 1105-1112.
- Jones, K. C. and P. de Voogt (1999). "Persistent organic pollutants (POPs): state of the science." *Environ Pollut* **100**(1-3): 209-221.
- Kakela, R. and H. Hyvarinen (1999). "Fatty acid alterations caused by PCBs (Aroclor 1242) and copper in adipose tissue around lymph nodes of mink." *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* **122**(1): 45-53.
- Kamijo, K., S. Taketani, S. Yokota, T. Osumi and T. Hashimoto (1990). "The 70-kDa peroxisomal membrane protein is a member of the Mdr (P-glycoprotein)-related ATP-binding protein superfamily." *J Biol Chem* **265**(8): 4534-4540.
- Keating, S. E., D. A. Hackett, J. George and N. A. Johnson (2012). "Exercise and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis." *J Hepatol* **57**(1): 157-166.

- Kistler, K. D., E. M. Brunt, J. M. Clark, A. M. Diehl, J. F. Sallis, J. B. Schwimmer and N. C. R. Group (2011). "Physical activity recommendations, exercise intensity, and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease." Am J Gastroenterol **106**(3): 460-468; quiz 469.
- Klionsky, D. J. (2007). "The importance of diversity." Autophagy **3**(2): 83-84.
- Klionsky, D. J. *et al* (2016). "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)." Autophagy **12**(1): 1-222.
- Koga, H., S. Kaushik and A. M. Cuervo (2010). "Altered lipid content inhibits autophagic vesicular fusion." FASEB J **24**(8): 3052-3065.
- Kohjima, M., M. Enjoji, N. Higuchi, M. Kato, K. Kotoh, T. Yoshimoto, T. Fujino, M. Yada, R. Yada, N. Harada, R. Takayanagi and M. Nakamura (2007). "Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease." Int J Mol Med **20**(3): 351-358.
- Kohli, K. K., B. N. Gupta, P. W. Albro, H. Mukhtar and J. D. McKinney (1979). "Biochemical effects of pure isomers of hexachlorobiphenyl: fatty livers and cell structure." Chem Biol Interact **25**(2-3): 139-156.
- Kohn, M. C. (2000). "Effects of TCDD on thyroid hormone homeostasis in the rat." Drug Chem Toxicol **23**(1): 259-277.
- Kopec, A. K., M. L. D'Souza, B. D. Mets, L. D. Burgoon, S. E. Reese, K. J. Archer, D. Potter, C. Tashiro, B. Sharratt, J. R. Harkema and T. R. Zacharewski (2011). "Non-additive hepatic gene expression elicited by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB153) co-treatment in C57BL/6 mice." Toxicol Appl Pharmacol **256**(2): 154-167.
- Kruger, T., M. Long, M. Ghisari and E. C. Bonefeld-Jorgensen (2012). "The combined effect of persistent organic pollutants in the serum POP mixture in Greenlandic Inuit: xenoestrogenic, xenoandrogenic and dioxin-like transactivities." Biomarkers **17**(8): 692-705.
- Kumar, P. A., P. S. Chitra and G. B. Reddy (2013). "Metabolic syndrome and associated chronic kidney diseases: nutritional interventions." Rev Endocr Metab Disord **14**(3): 273-286.
- L. Ritter, K. R. S., J. Forget (1995). "Les polluants organiques persistants" Le Programme international sur la sécurité des substances chimiques (PISSC) dans le cadre du Programme interorganisations de gestion écologiquement rationnelle des produits chimiques (IOMC).

- Lai, I., Y. Chai, D. Simmons, G. Luthe, M. C. Coleman, D. Spitz, W. M. Haschek, G. Ludewig and L. W. Robertson (2010). "Acute toxicity of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) in male Sprague-Dawley rats: effects on hepatic oxidative stress, glutathione and metals status." *Environ Int* **36**(8): 918-923.
- Lai, I. K., Y. Chai, D. Simmons, W. H. Watson, R. Tan, W. M. Haschek, K. Wang, B. Wang, G. Ludewig and L. W. Robertson (2011). "Dietary selenium as a modulator of PCB 126-induced hepatotoxicity in male Sprague-Dawley rats." *Toxicol Sci* **124**(1): 202-214.
- Lai, I. K., K. Dhakal, G. S. Gadupudi, M. Li, G. Ludewig, L. W. Robertson and A. K. Olivier (2012). "N-acetylcysteine (NAC) diminishes the severity of PCB 126-induced fatty liver in male rodents." *Toxicology* **302**(1): 25-33.
- Lakshman, M. R., P. Ghosh and S. J. Chirte (1991). "Mechanism of action of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on intermediary metabolism in the rat." *J Pharmacol Exp Ther* **258**(1): 317-319.
- Lavallard, V. J. and P. Gual (2014). "Autophagy and non-alcoholic fatty liver disease." *Biomed Res Int* **2014**: 120179.
- Laye, M. J., R. S. Rector, S. J. Borengasser, S. P. Naples, G. M. Uptergrove, J. A. Ibdah, F. W. Booth and J. P. Thyfault (2009). "Cessation of daily wheel running differentially alters fat oxidation capacity in liver, muscle, and adipose tissue." *J Appl Physiol* **106**(1): 161-168.
- Leahy, P., D. R. Crawford, G. Grossman, R. M. Gronostajski and R. W. Hanson (1999). "CREB binding protein coordinates the function of multiple transcription factors including nuclear factor I to regulate phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription." *J Biol Chem* **274**(13): 8813-8822.
- Lee, B., Y. Ahn, S. M. Kang, Y. Park, Y. J. Jeon, J. M. Rho and S. W. Kim (2015). "Stoichiometric expression of mtHsp40 and mtHsp70 modulates mitochondrial morphology and cristae structure via OpalL cleavage." *Mol Biol Cell* **26**(12): 2156-2167.
- Lee, D. H., I. K. Lee, K. Song, M. Steffes, W. Toscano, B. A. Baker and D. R. Jacobs, Jr. (2006). "A strong dose-response relation between serum concentrations of persistent organic pollutants and diabetes: results from the National Health and Examination Survey 1999-2002." *Diabetes Care* **29**(7): 1638-1644.
- Lee, H. K. (2010). "Persistent organic pollutants and epidemic of diabetes and metabolic syndrome." *J Diabetes Investig* **1**(4): 121-122.

- Lee, J. H., T. Wada, M. Febbraio, J. He, T. Matsubara, M. J. Lee, F. J. Gonzalez and W. Xie (2010). "A novel role for the dioxin receptor in fatty acid metabolism and hepatic steatosis." Gastroenterology **139**(2): 653-663.
- Leithner, K. (2015). "PEPCK in cancer cell starvation." Oncoscience **2**(10): 805-806.
- Leone, T. C., J. J. Lehman, B. N. Finck, P. J. Schaeffer, A. R. Wende, S. Boudina, M. Courtois, D. F. Wozniak, N. Sambandam, C. Bernal-Mizrachi, Z. Chen, J. O. Holloszy, D. M. Medeiros, R. E. Schmidt, J. E. Saffitz, E. D. Abel, C. F. Semenkovich and D. P. Kelly (2005). "PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis." PLoS Biol **3**(4): e101.
- Liu, W., S. S. Baker, R. D. Baker and L. Zhu (2015). "Antioxidant Mechanisms in Nonalcoholic Fatty Liver Disease." Curr Drug Targets **16**(12): 1301-1314.
- Loiola, R. A., F. M. Dos Anjos, A. L. Shimada, W. S. Cruz, C. C. Drewes, S. F. Rodrigues, K. H. Cardozo, V. M. Carvalho, E. Pinto and S. H. Farsky (2016). "Long-term in vivo polychlorinated biphenyl 126 exposure induces oxidative stress and alters proteomic profile on islets of Langerhans." Sci Rep **6**: 27882.
- Loncar, J., M. Popovic, R. Zaja and T. Smital (2010). "Gene expression analysis of the ABC efflux transporters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)."Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **151**(2): 209-215.
- Longnecker, M. P. and J. L. Daniels (2001). "Environmental contaminants as etiologic factors for diabetes." Environ Health Perspect **109 Suppl 6**: 871-876.
- Lopaschuk, G. D., J. R. Ussher, C. D. Folmes, J. S. Jaswal and W. C. Stanley (2010). "Myocardial fatty acid metabolism in health and disease." Physiol Rev **90**(1): 207-258.
- Louet, J. F., G. Hayhurst, F. J. Gonzalez, J. Girard and J. F. Decaux (2002). "The coactivator PGC-1 is involved in the regulation of the liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by cAMP in combination with HNF4 alpha and cAMP-response element-binding protein (CREB)." J Biol Chem **277**(41): 37991-38000.
- Macdonald, G. A. and J. B. Prins (2004). "Peroxisomal fatty acid metabolism, peroxisomal proliferator-activated receptors and non-alcoholic fatty liver disease." J Gastroenterol Hepatol **19**(12): 1335-1337.

- MacLellan, K., A. Singh, I. Chu, R. Poon and D. C. Villeneuve (1994). "Subchronic toxicity of pentachlorobiphenyl congeners n. 126 or 118 in the rat liver. An electron microscope study." J Submicrosc Cytol Pathol **26**(2): 279-291.
- Mandal, P. K. (2005). "Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology." J Comp Physiol B **175**(4): 221-230.
- Mannaerts, G. P. and P. P. Van Veldhoven (1993). "[Peroxisomal beta-oxidation]." Verh K Acad Geneeskd Belg **55**(1): 45-78.
- Mashek, D. G., K. E. Bornfeldt, R. A. Coleman, J. Berger, D. A. Bernlohr, P. Black, C. C. DiRusso, S. A. Farber, W. Guo, N. Hashimoto, V. Khodiyar, F. A. Kuypers, L. J. Maltais, D. W. Nebert, A. Renieri, J. E. Schaffer, A. Stahl, P. A. Watkins, V. Vasiliou and T. T. Yamamoto (2004). "Revised nomenclature for the mammalian long-chain acyl-CoA synthetase gene family." J Lipid Res **45**(10): 1958-1961.
- McIntosh, A. L., H. Huang, S. M. Storey, K. K. Landrock, D. Landrock, A. D. Petrescu, S. Gupta, B. P. Atshaves, A. B. Kier and F. Schroeder (2014). "Human FABP1 T94A variant impacts fatty acid metabolism and PPAR-alpha activation in cultured human female hepatocytes." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **307**(2): G164-176.
- Mehta, R., K. Jeiran, A. B. Koenig, M. Otgonsuren, Z. Goodman, A. Baranova and Z. Younossi (2016). "The role of mitochondrial genomics in patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH)." BMC Med Genet **17**(1): 63.
- Meinild Lundby, A. K., R. A. Jacobs, S. Gehrig, J. de Leur, M. Hauser, T. C. Bonne, D. Fluck, S. Dandanell, N. Kirk, A. Kaech, U. Ziegler, S. Larsen and C. Lundby (2017). "Exercise training increases skeletal muscle mitochondrial volume density by enlargement of existing mitochondria and not de novo biogenesis." Acta Physiol (Oxf).
- Meng, X., M. Li, J. Guo, W. Tang, S. Wang, Y. Man, X. Huang and J. Li (2014). "Protein phosphatase 4 promotes hepatic lipogenesis through dephosphorylating acetylCoA carboxylase 1 on serine 79." Mol Med Rep **10**(4): 1959-1963.
- Merino, R., E. Abad, J. Rivera and K. Olie (2007). "Evaluation of Organochlorine Compounds (PCDDs, PCDFs, PCBs and DDTs) in Two Raptor Species Inhabiting a Mediterranean Island in Spain (8 pp)." Environ Sci Pollut Res Int **14 Suppl 1**: 61-68.
- Mieyal, J. J. and G. Klopman (1994). "META. Part 2. A dictionary model of mammalian xenobiotic metabolism." Journal of Chemical Information & Computer Sciences **34**(6): 1326-1333.

- Monsalve, F. A., R. D. Pyarasani, F. Delgado-Lopez and R. Moore-Carrasco (2013). "Peroxisome proliferator-activated receptor targets for the treatment of metabolic diseases." Mediators Inflamm **2013**: 549627.
- Mori, C. and E. Todaka (2017). "For a healthier future: a virtuous cycle for reducing exposure to persistent organic pollutants." J Epidemiol Community Health.
- Morifuji, M., C. Sanbongi and K. Sugiura (2006). "Dietary soya protein intake and exercise training have an additive effect on skeletal muscle fatty acid oxidation enzyme activities and mRNA levels in rats." Br J Nutr **96**(3): 469-475.
- Mosser, J., A. M. Douar, C. O. Sarde, P. Kioschis, R. Feil, H. Moser, A. M. Poustka, J. L. Mandel and P. Aubourg (1993). "Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters." Nature **361**(6414): 726-730.
- Muller, A. S. and J. Pallauf (2002). "Down-regulation of GPx1 mRNA and the loss of GPx1 activity causes cellular damage in the liver of selenium-deficient rabbits." J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) **86**(9-10): 273-287.
- Mustonen, R., E. Elovaara, A. Zitting, K. Linnainmaa and H. Vainio (1989). "Effects of commercial chlorophenolate, 2,3,7,8-TCDD, and pure phenoxyacetic acids on hepatic peroxisome proliferation, xenobiotic metabolism and sister chromatid exchange in the rat." Arch Toxicol **63**(3): 203-208.
- Nakatani, T. and T. Yamano (2017). "Polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and dioxin-like coplanar polychlorinated biphenyls in mackerel obtained from the Japanese market during 1999-2003." Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.
- National Toxicology, P. (2006). "Toxicology and carcinogenesis studies of a binary mixture of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) (Cas No. 57465-28-8) and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB 153) (CAS No. 35065-27-1) in female Harlan Sprague-Dawley rats (gavage studies)." Natl Toxicol Program Tech Rep Ser(530): 1-258.
- Nault, R., K. A. Fader, T. A. Lydic and T. R. Zacharewski (2017). "Lipidomic evaluation of aryl hydrocarbon receptor-mediated hepatic steatosis in male and female mice by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin." Chem Res Toxicol.
- Navarro, A., C. Gomez, J. M. Lopez-Cepero and A. Boveris (2004). "Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **286**(3): R505-511.

- Nguyen, P., V. Leray, M. Diez, S. Serisier, J. Le Bloc'h, B. Siliart and H. Dumon (2008). "Liver lipid metabolism." J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) **92**(3): 272-283.
- Nyska, A., M. P. Jokinen, A. E. Brix, D. M. Sells, M. E. Wyde, D. Orzech, J. K. Haseman, G. Flake and N. J. Walker (2004). "Exocrine pancreatic pathology in female Harlan Sprague-Dawley rats after chronic treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and dioxin-like compounds." Environ Health Perspect **112**(8): 903-909.
- Okamoto, K., A. Brinker, S. A. Paschen, I. Moarefi, M. Hayer-Hartl, W. Neupert and M. Brunner (2002). "The protein import motor of mitochondria: a targeted molecular ratchet driving unfolding and translocation." EMBO J **21**(14): 3659-3671.
- Oscai, L. B. (1981). "Exercise and lipid metabolism." Prog Clin Biol Res **67**: 383-390.
- Palou, M., T. Priego, J. Sanchez, E. Villegas, A. M. Rodriguez, A. Palou and C. Pico (2008). "Sequential changes in the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue and liver in response to fasting." Pflugers Arch **456**(5): 825-836.
- Palrasu, M. and S. Nagini (2017). "Cytochrome P450 structure, function and clinical significance: A review." Curr Drug Targets.
- Pankiv, S., T. H. Clausen, T. Lamark, A. Brech, J. A. Bruun, H. Outzen, A. Overvatn, G. Bjorkoy and T. Johansen (2007). "p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy." J Biol Chem **282**(33): 24131-24145.
- Paradies, G., V. Paradies, F. M. Ruggiero and G. Petrosillo (2014). "Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease." World J Gastroenterol **20**(39): 14205-14218.
- Park, H. S., M. W. Kim and E. S. Shin (1995). "Effect of weight control on hepatic abnormalities in obese patients with fatty liver." J Korean Med Sci **10**(6): 414-421.
- Perez-Carreras, M., P. Del Hoyo, M. A. Martin, J. C. Rubio, A. Martin, G. Castellano, F. Colina, J. Arenas and J. A. Solis-Herruzo (2003). "Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis." Hepatology **38**(4): 999-1007.
- Pessayre, D., A. Mansouri, D. Haouzi and B. Fromenty (1999). "Hepatotoxicity due to mitochondrial dysfunction." Cell Biol Toxicol **15**(6): 367-373.

- Pirard, C., J. F. Focant and P. E. De (2002). "An improved clean-up strategy for simultaneous analysis of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDD), polychlorinated dibenzofurans (PCDF), and polychlorinated biphenyls (PCB) in fatty food samples." Anal Bioanal Chem **372**(2): 373-381.
- Pohjanvirta, R., S. Sankari, T. Kulju, A. Naukkarinen, M. Ylinen and J. Tuomisto (1990). "Studies on the role of lipid peroxidation in the acute toxicity of TCDD in rats." Pharmacol Toxicol **66**(5): 399-408.
- Polak, P., N. Cybulski, J. N. Feige, J. Auwerx, M. A. Ruegg and M. N. Hall (2008). "Adipose-specific knockout of raptor results in lean mice with enhanced mitochondrial respiration." Cell Metab **8**(5): 399-410.
- Preissner, S. C., M. F. Hoffmann, R. Preissner, M. Dunkel, A. Gewiess and S. Preissner (2013). "Polymorphic cytochrome P450 enzymes (CYPs) and their role in personalized therapy." PLoS One **8**(12): e82562.
- Ptak, G., F. Zacchini, M. Czernik, A. Fidanza, C. Palmieri, L. Della Salda, P. A. Scapolo and P. Loi (2012). "A short exposure to polychlorinated biphenyls deregulates cellular autophagy in mammalian blastocyst in vitro." Hum Reprod **27**(4): 1034-1042.
- Pyper, S. R., N. Viswakarma, S. Yu and J. K. Reddy (2010). "PPARalpha: energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer." Nucl Recept Signal **8**: e002.
- Radak, Z., H. Naito, T. Kaneko, S. Tahara, H. Nakamoto, R. Takahashi, F. Cardozo-Pelaez and S. Goto (2002). "Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle." Pflugers Arch **445**(2): 273-278.
- Rakhshandehroo, M., B. Knoch, M. Muller and S. Kersten (2010). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes." PPAR Res **2010**.
- Rantakokko, P., V. Mannisto, R. Airaksinen, J. Koponen, M. Viluksela, H. Kiviranta and J. Pihlajamaki (2015). "Persistent organic pollutants and non-alcoholic fatty liver disease in morbidly obese patients: a cohort study." Environ Health **14**: 79.
- Rector, R. S., J. P. Thyfault, M. J. Laye, R. T. Morris, S. J. Borengasser, G. M. Uptergrove, M. V. Chakravarthy, F. W. Booth and J. A. Ibdah (2008). "Cessation of daily exercise dramatically alters precursors of hepatic steatosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats." J Physiol **586**(17): 4241-4249.

- Rector, R. S., J. P. Thyfault, R. T. Morris, M. J. Laye, S. J. Borengasser, F. W. Booth and J. A. Ibdah (2008). "Daily exercise increases hepatic fatty acid oxidation and prevents steatosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **294**(3): G619-626.
- Reddy, J. K. and T. Hashimoto (2001). "Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system." Annu Rev Nutr **21**: 193-230.
- Reiner, Z., O. Guardamagna, D. Nair, H. Soran, K. Hovingh, S. Bertolini, S. Jones, M. Coric, S. Calandra, J. Hamilton, T. Eagleton and E. Ros (2014). "Lysosomal acid lipase deficiency--an under-recognized cause of dyslipidaemia and liver dysfunction." Atherosclerosis **235**(1): 21-30.
- Remillard, R. B. and N. J. Bunce (2002). "Linking dioxins to diabetes: epidemiology and biologic plausibility." Environ Health Perspect **110**(9): 853-858.
- Riget, F., K. Vorkamp, R. Bossi, C. Sonne, R. J. Letcher and R. Dietz (2016). "Twenty years of monitoring of persistent organic pollutants in Greenland biota. A review." Environ Pollut **217**: 114-123.
- Robertson, L. W., I. Berberian, T. Borges, L. C. Chen, C. K. Chow, H. P. Glauert, J. G. Filser and H. Thomas (2007). "Suppression of peroxisomal enzyme activities and cytochrome P450 4A isozyme expression by congeneric polybrominated and polychlorinated biphenyls." PPAR Res **2007**: 15481.
- Rucktaschel, R., W. Girzalsky and R. Erdmann (2011). "Protein import machineries of peroxisomes." Biochim Biophys Acta **1808**(3): 892-900.
- Rysavy, N. M., K. Maaetoft-Udsen and H. Turner (2013). "Dioxins: diagnostic and prognostic challenges arising from complex mechanisms." J Appl Toxicol **33**(1): 1-8.
- Sakaue, H., S. Iwashita, Y. Yamashita, Y. Kida and M. Sakaguchi (2016). "The N-terminal motif of PMP70 suppresses cotranslational targeting to the endoplasmic reticulum." J Biochem **159**(5): 539-551.
- Santos, J. M., S. Tewari and S. A. Benite-Ribeiro (2014). "The effect of exercise on epigenetic modifications of PGC1: The impact on type 2 diabetes." Med Hypotheses **82**(6): 748-753.
- Sathyanarayan, A., M. T. Mashek and D. G. Mashek (2017). "ATGL Promotes Autophagy/Lipophagy via SIRT1 to Control Hepatic Lipid Droplet Catabolism." Cell Rep **19**(1): 1-9.

- Schechter, A., P. Cramer, K. Boggess, J. Stanley, O. Papke, J. Olson, A. Silver and M. Schmitz (2001). "Intake of dioxins and related compounds from food in the U.S. population." J Toxicol Environ Health A **63**(1): 1-18.
- Schechter, A., L. C. Dai, O. Papke, J. Prange, J. D. Constable, M. Matsuda, V. D. Thao and A. L. Piskac (2001). "Recent dioxin contamination from Agent Orange in residents of a southern Vietnam city." J Occup Environ Med **43**(5): 435-443.
- Schlezinger, J. J., R. D. White and J. J. Stegeman (1999). "Oxidative inactivation of cytochrome P-450 1A (CYP1A) stimulated by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl: production of reactive oxygen by vertebrate CYP1As." Mol Pharmacol **56**(3): 588-597.
- Sekiya, M., J. Osuga, N. Yahagi, H. Okazaki, Y. Tamura, M. Igarashi, S. Takase, K. Harada, S. Okazaki, Y. Iizuka, K. Ohashi, H. Yagyu, M. Okazaki, T. Gotoda, R. Nagai, T. Kadokawa, H. Shimano, N. Yamada and S. Ishibashi (2008). "Hormone-sensitive lipase is involved in hepatic cholesteryl ester hydrolysis." J Lipid Res **49**(8): 1829-1838.
- Shi, Q., X. Song, Z. Liu, Y. Wang, Y. Wang, J. Fu, C. Su, X. Xia, E. Song and Y. Song (2016). "Quinones Derived from Polychlorinated Biphenyls Induce ROS-Dependent Autophagy by Evoking an Autophagic Flux and Inhibition of mTOR/p70S6k." Chem Res Toxicol **29**(7): 1160-1171.
- Shojaee-Moradie, F., D. J. Cuthbertson, M. Barrett, N. C. Jackson, R. Herring, E. L. Thomas, J. Bell, G. J. Kemp, J. Wright and A. M. Umpleby (2016). "Exercise Training Reduces Liver Fat and Increases Rates of VLDL Clearance But Not VLDL Production in NAFLD." J Clin Endocrinol Metab **101**(11): 4219-4228.
- Simmons, S. O., C. Y. Fan and R. Ramabhadran (2009). "Cellular stress response pathway system as a sentinel ensemble in toxicological screening." Toxicol Sci **111**(2): 202-225.
- Singh, R., S. Kaushik, Y. Wang, Y. Xiang, I. Novak, M. Komatsu, K. Tanaka, A. M. Cuervo and M. J. Czaja (2009). "Autophagy regulates lipid metabolism." Nature **458**(7242): 1131-1135.
- Singh, R., Y. Xiang, Y. Wang, K. Baikati, A. M. Cuervo, Y. K. Luu, Y. Tang, J. E. Pessin, G. J. Schwartz and M. J. Czaja (2009). "Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice." J Clin Invest **119**(11): 3329-3339.
- Souza-Mello, V. (2015). "Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat non-alcoholic fatty liver disease." World J Hepatol **7**(8): 1012-1019.

- Souza-Mello, V., B. M. Gregorio, F. S. Cardoso-de-Lemos, L. de Carvalho, M. B. Aguila and C. A. Mandarim-de-Lacerda (2010). "Comparative effects of telmisartan, sitagliptin and metformin alone or in combination on obesity, insulin resistance, and liver and pancreas remodelling in C57BL/6 mice fed on a very high-fat diet." Clin Sci (Lond) **119**(6): 239-250.
- Takaki, A., D. Kawai and K. Yamamoto (2013). "Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH)." Int J Mol Sci **14**(10): 20704-20728.
- Testa, B., A. Pedretti and G. Vistoli (2012). "Reactions and enzymes in the metabolism of drugs and other xenobiotics." Drug Discov Today **17**(11-12): 549-560.
- Thorens, B. (1996). "Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes." Am J Physiol **270**(4 Pt 1): G541-553.
- Tilg, H., A. R. Moschen and M. Roden (2016). "NAFLD and diabetes mellitus." Nat Rev Gastroenterol Hepatol.
- Twaroski, T. P., M. L. O'Brien and L. W. Robertson (2001). "Effects of selected polychlorinated biphenyl (PCB) congeners on hepatic glutathione, glutathione-related enzymes, and selenium status: implications for oxidative stress." Biochem Pharmacol **62**(3): 273-281.
- Van den Berg, M., L. Birnbaum, A. T. Bosveld, B. Brunstrom, P. Cook, M. Feeley, J. P. Giesy, A. Hanberg, R. Hasegawa, S. W. Kennedy, T. Kubiak, J. C. Larsen, F. X. van Leeuwen, A. K. Liem, C. Nolt, R. E. Peterson, L. Poellinger, S. Safe, D. Schrenk, D. Tillitt, M. Tysklind, M. Younes, F. Waern and T. Zacharewski (1998). "Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife." Environ Health Perspect **106**(12): 775-792.
- Van den Berg, M., L. S. Birnbaum, M. Denison, M. De Vito, W. Farland, M. Feeley, H. Fiedler, H. Hakansson, A. Hanberg, L. Haws, M. Rose, S. Safe, D. Schrenk, C. Tohyama, A. Tritscher, J. Tuomisto, M. Tysklind, N. Walker and R. E. Peterson (2006). "The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds." Toxicol Sci **93**(2): 223-241.
- van Roermund, C. W., W. F. Visser, L. Ijlst, A. van Cruchten, M. Boek, W. Kulik, H. R. Waterham and R. J. Wanders (2008). "The human peroxisomal ABC half transporter ALDP functions as a homodimer and accepts acyl-CoA esters." FASEB J **22**(12): 4201-4208.

- van Vlies, N., J. P. Ruiter, M. Doolaard, R. J. Wanders and F. M. Vaz (2007). "An improved enzyme assay for carnitine palmitoyl transferase I in fibroblasts using tandem mass spectrometry." Mol Genet Metab **90**(1): 24-29.
- Verhaert, V., N. Newmark, W. D'Hollander, A. Covaci, W. Vlok, V. Wepener, A. Addo-Bediako, A. Jooste, J. Teuchies, R. Blust and L. Bervoets (2017). "Persistent organic pollutants in the Olifants River Basin, South Africa: Bioaccumulation and trophic transfer through a subtropical aquatic food web." Sci Total Environ **586**: 792-806.
- Vespasiani-Gentilucci, U., P. Gallo, F. Piemonte, E. Riva, A. Porcari, F. Vorini, G. Tozzi, L. Piccioni, G. Galati, A. De Vincentis, S. Carotti, S. Morini, J. D'Amico, S. Angeletti, C. Pedone and A. Picardi (2016). "Lysosomal Acid Lipase Activity Is Reduced Both in Cryptogenic Cirrhosis and in Cirrhosis of Known Etiology." PLoS One **11**(5): e0156113.
- Vizuete, J., A. Camero, M. Malakouti, K. Garapati and J. Gutierrez (2017). "Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An Overview of Present and Future Therapies." J Clin Transl Hepatol **5**(1): 67-75.
- Vorrink, S. U., E. H. Sarsour, A. K. Olivier, L. W. Robertson, P. C. Goswami and F. E. Domann (2014). "PCB 126 perturbs hypoxia-induced HIF-1alpha activity and glucose consumption in human HepG2 cells." Exp Toxicol Pathol **66**(8): 377-382.
- Wadhwa, R., K. Taira and S. C. Kaul (2002). "An Hsp70 family chaperone, mortalin/mthsp70/PBP74/Grp75: what, when, and where?" Cell Stress Chaperones **7**(3): 309-316.
- Wahlang, B., M. Song, J. I. Beier, K. Cameron Falkner, L. Al-Eryani, H. B. Clair, R. A. Prough, T. S. Osborne, D. E. Malarkey, J. Christopher States and M. C. Cave (2014). "Evaluation of Aroclor 1260 exposure in a mouse model of diet-induced obesity and non-alcoholic fatty liver disease." Toxicol Appl Pharmacol **279**(3): 380-390.
- Wanders, R. J., J. P. Ruiter, I. J. L, H. R. Waterham and S. M. Houten (2010). "The enzymology of mitochondrial fatty acid beta-oxidation and its application to follow-up analysis of positive neonatal screening results." J Inherit Metab Dis **33**(5): 479-494.
- Wang, X., Y. Teng, N. Zhang, P. Christie, Z. Li, Y. Luo and J. Wang (2017). "Rhizobial symbiosis alleviates polychlorinated biphenyls-induced systematic oxidative stress via brassinosteroids signaling in alfalfa." Sci Total Environ **592**: 68-77.

- Wang, Y., W. Zhang, R. Fan, G. Sheng and J. Fu (2014). "Biological monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in subjects living in the area of recycling electronic garbage, in Southern China." Environ Sci Pollut Res Int **21**(15): 9161-9168.
- Ward, C., N. Martinez-Lopez, E. G. Otten, B. Carroll, D. Maetzel, R. Singh, S. Sarkar and V. I. Korolchuk (2016). "Autophagy, lipophagy and lysosomal lipid storage disorders." Biochim Biophys Acta **1861**(4): 269-284.
- Watanabe, M. X., T. Kunisue, N. Ueda, M. Nose, S. Tanabe and H. Iwata (2013). "Toxicokinetics of dioxins and other organochlorine compounds in Japanese people: association with hepatic CYP1A2 expression levels." Environ Int **53**: 53-61.
- Weber, R., C. Gaus, M. Tysklind, P. Johnston, M. Forter, H. Hollert, E. Heinisch, I. Holoubek, M. Lloyd-Smith, S. Masunaga, P. Moccarelli, D. Santillo, N. Seike, R. Symons, J. P. Torres, M. Verta, G. Varbelow, J. Vijgen, A. Watson, P. Costner, J. Woelz, P. Wycisk and M. Zennegg (2008). "Dioxin- and POP-contaminated sites-contemporary and future relevance and challenges: overview on background, aims and scope of the series." Environ Sci Pollut Res Int **15**(5): 363-393.
- Weiss, E. P. and J. O. Holloszy (2007). "Improvements in body composition, glucose tolerance, and insulin action induced by increasing energy expenditure or decreasing energy intake." J Nutr **137**(4): 1087-1090.
- Weng, H., X. Ji, Y. Naito, K. Endo, X. Ma, R. Takahashi, C. Shen, G. Hirokawa, Y. Fukushima and N. Iwai (2013). "Pex11alpha deficiency impairs peroxisome elongation and division and contributes to nonalcoholic fatty liver in mice." Am J Physiol Endocrinol Metab **304**(2): E187-196.
- White, S. S. and L. S. Birnbaum (2009). "An overview of the effects of dioxins and dioxin-like compounds on vertebrates, as documented in human and ecological epidemiology." J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev **27**(4): 197-211.
- Wu, H., W. Yu, F. Meng, J. Mi, J. Peng, J. Liu, X. Zhang, C. Hai and X. Wang (2017). "Polychlorinated biphenyls-153 induces metabolic dysfunction through activation of ROS/NF-kappaB signaling via downregulation of HNF1b." Redox Biol **12**: 300-310.
- Wu, Z., P. Puigserver, U. Andersson, C. Zhang, G. Adelman, V. Mootha, A. Troy, S. Cinti, B. Lowell, R. C. Scarpulla and B. M. Spiegelman (1999). "Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1." Cell **98**(1): 115-124.

- Wyckelsma, V. L., I. Levinger, M. J. McKenna, L. E. Formosa, M. T. Ryan, A. C. Petersen, M. J. Anderson and R. M. Murphy (2017). "Preservation of skeletal muscle mitochondrial content in older adults: relationship between mitochondria, fibre type and high-intensity exercise training." *J Physiol* **595**(11): 3345-3359.
- Xie, Z. and D. J. Klionsky (2007). "Autophagosome formation: core machinery and adaptations." *Nat Cell Biol* **9**(10): 1102-1109.
- Xiong, J., K. Wang, J. He, G. Zhang, D. Zhang and F. Chen (2016). "TFE3 Alleviates Hepatic Steatosis through Autophagy-Induced Lipophagy and PGC1alpha-Mediated Fatty Acid beta-Oxidation." *Int J Mol Sci* **17**(3): 387.
- Xiong, Y., Q. Y. Lei, S. Zhao and K. L. Guan (2011). "Regulation of glycolysis and gluconeogenesis by acetylation of PKM and PEPCK." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **76**: 285-289.
- Yasari, S., A. Paquette, A. Charbonneau, M. S. Gauthier, R. Savard and J. M. Lavoie (2006). "Effects of ingesting a high-fat diet upon exercise-training cessation on fat accretion in the liver and adipose tissue of rats." *Appl Physiol Nutr Metab* **31**(4): 367-375.
- Yelamanchi, S. D., H. S. Solanki, A. Radhakrishnan, L. Balakrishnan, J. Advani, R. Raja, N. A. Sahasrabuddhe, P. P. Mathur, P. Dutta, T. S. Prasad, M. Korbonits, A. Chatterjee, H. Gowda and K. K. Mukherjee (2016). "Signaling network map of the aryl hydrocarbon receptor." *J Cell Commun Signal* **10**(4): 341-346.
- Yi, X., S. Cao, B. Chang, D. Zhao, H. Gao, Y. Wan, J. Shi, W. Wei and Y. Guan (2013). "Effects of acute exercise and chronic exercise on the liver leptin-AMPK-ACC signaling pathway in rats with type 2 diabetes." *J Diabetes Res* **2013**: 946432.
- Yoon, J. C., P. Puigserver, G. Chen, J. Donovan, Z. Wu, J. Rhee, G. Adelman, J. Stafford, C. R. Kahn, D. K. Granner, C. B. Newgard and B. M. Spiegelman (2001). "Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1." *Nature* **413**(6852): 131-138.
- Yoshizawa, K., A. Heatherly, D. E. Malarkey, N. J. Walker and A. Nyska (2007). "A critical comparison of murine pathology and epidemiological data of TCDD, PCB126, and PeCDF." *Toxicol Pathol* **35**(7): 865-879.
- Zaarour, N., M. Berenguer, Y. Le Marchand-Brustel and R. Govers (2012). "Deciphering the role of GLUT4 N-glycosylation in adipocyte and muscle cell models." *Biochem J* **445**(2): 265-273.

Zamani, M., J. Taher and K. Adeli (2016). "Complex role of autophagy in regulation of hepatic lipid and lipoprotein metabolism." J Biomed Res **30**.

Zhang, J., H. Liu, S. Luo, Z. Lu, A. Chavez-Badiola, Z. Liu, M. Yang, Z. Merhi, S. J. Silber, S. Munne, M. Konstandinidis, D. Wells and T. Huang (2017). "Live birth derived from oocyte spindle transfer to prevent mitochondrial disease." Reprod Biomed Online **34**(4): 361-368.

Zhu, C., P. Xie, F. Zhao, L. Zhang, W. An and Y. Zhan (2014). "Mechanism of the promotion of steatotic HepG2 cell apoptosis by cholesterol." Int J Clin Exp Pathol **7**(10): 6807-6813.