

Les Acyl-CoA Synthétases Longues Chaînes 4 (ACSL4): leur rôle dans la réponse du myoblaste
squelettique au Mono-(2 Éthyl Hexyl) Phtalate (MEHP)

Barrakatou Ligali Epse Cissé

Superviseure: Dr. Frédérique Tesson

Thèse soumise dans le cadre des exigences du programme de Maîtrise en Sciences
Interdisciplinaires de la Santé

École Interdisciplinaire des Sciences de la Santé
Faculté des Sciences de la Santé
Université d'Ottawa
Ottawa, Ontario, Canada



uOttawa

Résumé

Introduction: Le MEHP est un métabolite de phtalate impliqué dans le développement de l'obésité. Les acyl-CoA synthétases longues chaînes (ACSL) jouent un rôle essentiel dans la régulation du métabolisme des acides gras. Notre étude s'est intéressée à l'effet du MEHP sur les ACSL4 dans les cellules musculaires squelettiques.

Objectifs: Déterminer dans les myoblastes C2C12, l'effet du MEHP sur les variations d'expression des ACSL4 (ARNm et protéines) et l'accumulation des lipides.

Méthodes: Dans les myoblastes C2C12 exposés au MEHP, l'expression des ACSL4 a été déterminée par RT-qPCR et Western blots. La quantification des lipides a été évaluée par fluorimétrie après extraction organique.

Résultats: Le MEHP entraîne une tendance à l'augmentation dose dépendante des niveaux des ARNm ACSL4, une tendance à la diminution des niveaux des protéines ACSL4 mais n'entraîne pas d'augmentation des concentrations de lipides dans les C2C12.

Conclusion/ Importance: Nos résultats pourraient être utiles dans la recherche de solutions à l'obésité liée à l'exposition au MEHP.

Abstract

Introduction: MEHP is a phthalate metabolite implicated in the development of obesity. Acyl-CoA synthetases long-chain (ACSL) play a critical role in the regulation of fatty acid metabolism. Our study investigated the effect of MEHP on ACSL4 in skeletal muscle cells.

Objectives: To determine in C2C12 myoblasts, the effect of MEHP on ACSL4 expression changes (mRNA and protein) and lipid accumulation.

Methods: In C2C12 myoblasts exposed to MEHP, ACSL4 expression was determined by RT-qPCR and Western blots. Lipid quantification was assessed by fluorimetry after organic extraction.

Results: MEHP causes a dose-dependent trend toward increased ACSL4 mRNA levels, a trend toward decreased ACSL4 protein levels, but does not cause an increase in C2C12 lipid levels.

Conclusion/Significance: Our results could be useful in the search for solutions to MEHP exposure-related obesity.

Sommaire

Table of Contents

Résumé	ii
Abstract	iii
Sommaire.....	iv
Liste des figures	vi
Liste des tableaux.....	vii
Abréviations.....	viii
Remerciements	x
Chapitre 1: Introduction	1
1.1 Le DEHP	2
1.2 Le DEHP, le MEHP et la mesure de leurs concentrations dans les matrices biologiques.....	3
1.3 Effets du DEHP et du MEHP	4
1.4 Le métabolisme des acides gras (MAG) à longues chaînes dans le muscle squelettique	9
Chapitre 2: Problématique -Hypothèse-Objectives.....	37
2.1 Problématique	37
2.2 Hypothèse	38
2.3 Objectifs	38
Chapitre 3: MÉTHODES	39
3.1 Culture des cellules.....	39
3.2 Exposition des cellules au MEHP	39
3.3-Amplification en chaîne par Polymérase, couplée à une transcription inverse en temps réel quantitative (RT-qPCR)	40
3.4 Western Blots	41
3.5 Détermination de l'accumulation des lipides	42
3.6 Statistiques	43
Chapitre 4: RÉSULTATS.....	44
4.1 Les effets de l'exposition des myoblastes C2C12 au MEHP sur les ARNm ACSL4	44
4.2 Les effets de l'exposition des myoblastes C2C12 au MEHP sur les protéines ACSL4	48
4.3 Les effets de l'exposition des myoblastes C2C12 au MEHP sur l'accumulation des lipides.....	51
Chapitre 5 : DISCUSSION	53
5.1 Les effets de l'exposition des myoblastes C2C12 au MEHP sur l'expression des ACSL4.....	53

5.2 Les effets de l'exposition des myoblastes C2C12 au MEHP sur les protéines ACSL4	57
5.3 Les effets de l'exposition des myoblastes C2C12 au MEHP sur l'accumulation des lipides	60
BIBLIOGRAPHIE	67
ANNEXE A: Manuscrit à publier	85
ANNEXE B: Permissions	124

Liste des figures

Figure 1: Schéma des transformations métaboliques du DEHP, du MEHP et du MEHHP	3
Figure 2: Structure d'un triglycéride	10
Figure 3: Localisation des CD36, FATP et composition des gouttelettes lipidiques (LD) dans le muscle squelettique	14
Figure 4: Principales protéines impliquées dans l'absorption, le transport et la lipolyse des AG au cours de leur métabolisme	15
Figure 5: Le rôle des FABPc au niveau des PPAR dans les cellules musculaires squelettiques Cytoplasmic fatty acid binding protein sensing fatty acids for peroxisome proliferator activated receptor activation.....	16
Figure 6: Localisation des protéines impliquées dans le transport mitochondrial des AG à longue chaîne	29
Figure 7: Cycle de la β -oxydation.....	30
Figure 8: Résumé du métabolisme des acides gras dans le muscle squelettique.....	34
Figure 9: Stabilité des gènes de références β -actine, Ywhaz et GAPDH.....	47
Figure 10: Les effets du MEHP sur les ARNm d'ACSL4 dans les myoblastes C2C12	48
Figure 11: Les effets du MEHP sur les quantités d'ACSL4 dans les myoblastes C2C12	50
Figure 12: Corrélation entre les quantités relatives d'ARNm et de protéines ACSL4 issus des myoblastes C2C12	51
Figure 13: Les effets du MEHP sur les concentrations de lipides dans les myoblastes C2C12	52
Figure 14: Mécanisme potentiel du rôle des ACSL4 et ACSL5 dans le métabolisme des acides gras (FA) dans les myoblastes C2C12 en conditions physiologiques.....	64
Figure 15: Mécanisme potentiel du rôle des ACSL4 et ACSL5 dans le métabolisme des acides gras (FA) dans les myoblastes C2C12 en présence de MEHP	65

Liste des tableaux

Tableau 1: Résumé de la synergie de l'activité des ACSL dans le muscle squelettique de souris	27
Tableau 2: Résumé des phénomènes de compensation de l'activité de certaines ACSL	27
Tableau 3: Séquences d'amorces de RT-qPCR.....	41
Tableau 4: Ratios A260/A280	45
Tableau 5: Ratios A260/A230	45

Abréviations

AA	Acide arachidonique
ACSL	Acyl-CoA Synthétase Longue Chaîne
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AG	Acides Gras
AGLC	Acide gras à longues chaînes
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ASP	Produits acides solubles
ATGL	Adipose triglycérade lipases
ATP	Adénosine triphosphate
CD36	Cluster of Differentiation 36
CGI-58	Comparative gene identification-58
CPT	Carnitine-palmitoyl transférase
DEHP	Di (2-Éthyl Hexyl) Phtalate
DGAT	DAG-O-acyltransférase
Dnmts	DNA méthyltransférases
DOHaD	Origines développementales de la santé et de la maladie
ETF	Système de transport d'électrons
FA	Fatty acids
FABP	Protéines liant les acides gras
FABPc	Protéines liant les acides gras cytosoliques
FABPpm	Protéines liant les acides gras associées à la membrane cellulaire
FAD	Flavine-adénine dinucléotide
FATP	Protéines de transport des acides gras ETF
HSL	Hormone-sensitive lipases
IMC	Indice de Masse Corporelle

IMCL	Lipides intramyocellulaires
IMTG	Triglycéride intramusculaire
LCFA	Acide gras à longues chaînes
LCHAD	Long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
LD	Gouttelettes lipidiques
LPL	Lipoprotein lipase
MAG	Métabolisme des Acides Gras
MAG-DAG	Mono-acylglycérol-diacylglycérol
MEHHP	Mono-(2-Éthyl-5-Hydroxy Hexyl) Phtalate
MEHP	Mono-(2 Éthyl Hexyl) Phtalate
MEOHP	Mono-(2-Éthyl-5-Oxy Hexyl) Phtalate
MGAT	Monoacylglycérol acyl-transférase
mLPL	Lipoprotéine lipase musculaire
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
PCK1	Phosphoénolpyruvate Carboxykinase 1
PDK4	Pyruvate Deshydrogénase Kinase 4
PLIN	Perilipin
PPARα	Récepteur alpha activé par les proliférateurs de peroxyosomes
PPARγ	Récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosomes
PVC	Polychlorure de Vinyle
RE	Réticulum endoplasmique
RXR	Retinoid X receptor
Tets	Méthylcytosines dioxygénases à translocation 10-11
TG	Triglycérides
VLCAD	Very long chain acyl-CoA dehydrogenase
VLDL	Very Low-Density Lipoprotein

Remerciements

J'aimerais remercier les personnes suivantes pour leurs contributions et leurs soutiens dans la réalisation de ma thèse.

Superviseure: J'aimerais très sincèrement remercier **Dr. Frédérique Tesson** de m'avoir donné l'opportunité de travailler dans son laboratoire. Je suis très reconnaissante pour sa contribution à mon évolution dans la recherche à travers sa motivation et son amour pour la recherche, ses conseils avisés, sa disponibilité. Ce fut très agréable et enrichissant pour moi d'apprendre auprès d'elle.

Membres du comité de thèse et examinateurs: **Dr. Yann Burelle**, pour son temps et ses suggestions sur ma proposition de thèse. **Dr. Chantal Matar**, pour son temps, ses suggestions au niveau de ma proposition de thèse et ma thèse, aussi pour sa participation à la défense de ma thèse. **Dr. Anne Konkle**, pour son temps, ses suggestions au niveau de ma thèse et sa participation à la défense de ma thèse.

Étudiants du laboratoire de Dr. Tesson: J'aimerais remercier particulièrement **Dr. Hannah Nicolas** avec qui j'ai beaucoup appris dans le laboratoire aussi pour ses conseils et sa gentillesse. **Dr. Abishankari Rajkumar** pour ses conseils au niveau de la préparation des solutions de MEHP. **Dr. Jasdeep Kaur** pour ses suggestions au niveau des séquences consensus. **Corinne Waked** pour ses conseils au niveau de l'analyse statistique.

Famille: J'aimerais particulièrement remercier mon époux **Vadihawé Cissé** pour son soutien indescriptible, ainsi que mes enfants pour leur soutien émotionnel. Ma mère et mes frères pour leurs encouragements.

Autres: Nawal Alsadi et Dr. Jean François Mallet du labo de Dr. Matar pour leurs conseils au niveau des RT-qPCR. **Dr. Roger S. Zoh** pour ses conseils et son avis d'expert en statistique.

Chapitre 1: Introduction

À l'échelle mondiale, les cas d'obésité ont presque triplé depuis 1975 avec plus de 650 millions d'individus adultes obèses en 2016 (World Health Organization, 2018). L'obésité est une accumulation excessive de graisses chez un individu. C'est un facteur de risque de plusieurs maladies chroniques comme les maladies cardiovasculaires, le diabète et le cancer (World Health Organization, 2018). L'obésité est déterminée par un indice de masse corporelle (IMC) supérieur ou égal à 30 kg/m^2 chez l'adulte (World Health Organization, 2018). L'obésité abdominale est déterminée par la mesure du tour de taille $\geq 88 \text{ cm}$ pour les femmes; $\geq 102 \text{ cm}$ pour les hommes (National heart lung and blood institute, n.d.; Ross et al., 2020; World Health Organization, 2018). La mesure du tour de taille permet d'évaluer les risques liés à la morbidité et la mortalité cardiométabolique (Ross et al., 2020). Aux États-Unis, on estime les dépenses médicales liées à l'obésité à 149,4 milliards de dollars par an (David & Anirban, 2016). L'obésité est favorisée entre autres par des facteurs génétiques, épigénétiques, comportementaux tels que les habitudes alimentaires malsaines et l'inactivité physique, mais aussi par l'exposition à des facteurs environnementaux tels que des obésogènes. Les obésogènes sont des produits chimiques qui altèrent le métabolisme des lipides en stimulant l'accumulation des lipides et l'adipogenèse, ce qui pourrait favoriser l'obésité (Grün & Blumberg, 2006).

1.1 Le DEHP

Parmi ces obésogènes, il y a le Di (2-Éthyl Hexyl) Phtalate (DEHP) qu'on retrouve couramment dans l'environnement au Canada (Santé Canada, 2019).

Le DEHP est l'un des principaux plastifiants à base de phtalate utilisé pour augmenter la flexibilité, la transparence et la durabilité du plastique à moindre coût (Cao, 2010; Chen et al., 2020; Gouvernement du Canada, 2021). On retrouve le DEHP dans la composition des emballages plastiques de produits alimentaires, les bouteilles en plastique, du matériel médical comme les poches de sang et les tubules de perfusions, des médicaments sans ordonnance, des produits de soins personnels (Kavlock et al., 2006; Santé Canada, 2019). Le DEHP n'a pas de liaisons covalentes avec sa matrice plastique (polychlorure de vinyle (PVC) par exemple). Il peut se détacher pour ensuite se retrouver dans l'environnement et dans l'organisme par l'ingestion, l'inhalation ou par voie cutanée (Koch, Preuss, & Angerer, 2006). Le DEHP est lipophile, ce qui lui permet de se dissoudre facilement dans les graisses (Schaedlich et al., 2018). Il peut donc se détacher de sa matrice et se dissoudre plus facilement dans des aliments riches en gras comparés à des aliments pauvres en gras emballés dans une matrice plastique contenant le DEHP (Schaedlich et al., 2018). Une étude portant sur l'utilisation des tubules de perfusion à base de PVC pour la nutrition parentérale a mis en évidence que le type d'huile présent dans la solution nutritive en contact avec les tubules de perfusion influençait la concentration de DEHP dans la solution nutritive (Bagel et al., 2011). Une association positive a été mise en évidence entre l'augmentation de la température (24° à 37°C) des émulsions lipidiques en contact avec les tubules de perfusion en PVC et la concentration de DEHP dans ces émulsions (Rose, Priston, Rigby-Jones, & Sneyd, 2012). Ainsi le DEHP se détache plus facilement du plastique selon la

température et le type de solutions lipidiques avec lequel il est en contact. En Amérique du nord, l'emballage des aliments représente la principale source d'exposition au DEHP, la seconde source étant la pollution de l'air (Chiang et al., 2016).

1.2 Le DEHP, le MEHP et la mesure de leurs concentrations dans les matrices biologiques

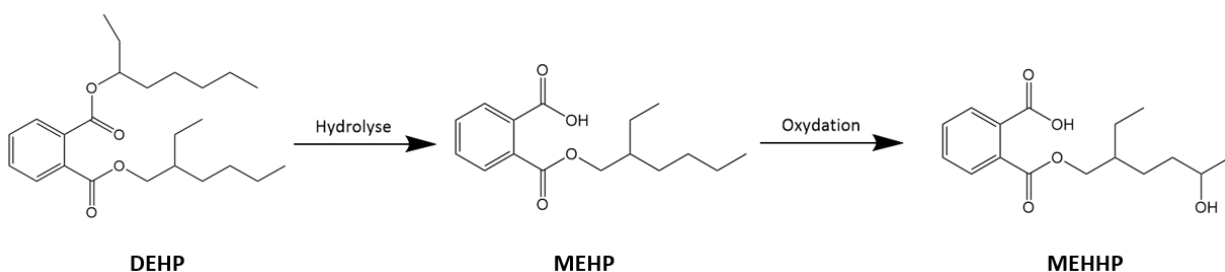


Figure 1: Schéma des transformations métaboliques du DEHP, du MEHP et du MEHHP

Dans l'organisme, le DEHP peut être métabolisé en Mono-(2 Éthyl Hexyl) Phtalate (MEHP), qui est la forme active du DEHP qui est associée à l'obésité (Figure 1) (Koch et al., 2006). La population canadienne est en moyenne exposée à des doses journalières de DEHP estimées entre 5,8 et 19 µg/kg (Meek & Chan, 1994). Chez des individus exposés à un environnement médical, les doses journalières moyennes de DEHP peuvent atteindre 167,9 mg/jour (Kavlock et al., 2002; Xu, Cook, & Knipp, 2005).

La grande majorité des études sur le DEHP/MEHP évalue les concentrations de ces phtalates dans les urines (Wang et al., 2019). À l'état actuel de nos connaissances l'évaluation des concentrations du DEHP/MEHP dans les urines semble meilleure comparée à celles dans les autres matrices biologiques telles que le sang, le lait maternel, le sperme et les ongles dont

l'utilité reste largement inconnue en raison du nombre limité de données (Wang et al., 2019). Ainsi dans certaines études, la concentration du MEHP est plus faible dans le sérum que dans les urines. Une étude réalisée sur des jeunes hommes danois a montré des concentrations des métabolites de DEHP égales à 6.74 µg/L dans le sérum, 0.45 µg/L dans le plasma séminal et 9.18 µg/L dans les urines (Frederiksen, Jorgensen, & Andersson, 2010). Les concentrations urinaires de métabolites de DEHP étant plus élevées que dans les autres matrices biologiques font de cette méthode une bonne méthode fréquemment utilisées.

Dans une étude sur les concentrations de phtalate dans le sang, le sérum, le lait et les urines de 128 femmes en post-partum en bonne santé, les concentrations médianes de MEHP étaient de 0.49 µg/L dans le sang, le sérum et le lait maternel (Högberg et al., 2008). Ces concentrations étaient plus faibles que celles dans les urines qui étaient de 9 µg/L (Högberg et al., 2008).

Ceci suggère que les concentrations urinaires de DEHP/MEHP sont plus fiables comparées à celles dans les autres matrices pour évaluer l'exposition humaine à ces phtalates et métabolites de phtalates. C'est pour toutes ces raisons que les études de biosurveillance de l'exposition des humains aux phtalates sont basées en grande majorité sur les concentrations urinaires de métabolites de phtalates (Högberg et al., 2008; Wang et al., 2019).

1.3 Effets du DEHP et du MEHP

L'exposition au MEHP en général a été associée à des anomalies du développement et, au stress oxydatif entre autres (Benjamin et al., 2017; Jacobs et al., 2018). L'exposition au MEHP à des concentrations moyennes de 1 µM , et 1800 µM dans l'urine a été associée à l'obésité tandis que

celle à une concentration moyenne de 0.074 μM dans le sang a été associée à des troubles neurodéveloppementaux (Benjamin et al., 2017; Jacobs et al., 2018).

Pour toutes ces raisons, l'utilisation du DEHP au Canada a été interdite dans les produits cosmétiques en 2009, et réglementée dans les jouets d'enfants en juin 2011 (Santé Canada, 2019). À la suite de la mise en place de ces mesures, l'exposition au DEHP de la population Canadienne a diminué entre 2016-2017, avec des concentrations urinaires des métabolites de DEHP dans la population canadienne (âgée de 6 à 79 ans) qui sont passées de 22 $\mu\text{g/L}$ à 9.7 $\mu\text{g/L}$ (Gouvernement du Canada, 2021).

Cependant, le DEHP est encore présent dans des équipements médicaux comme les dispositifs de perfusion en PVC, en raison de sa capacité à augmenter la flexibilité du PVC à moindre coût (Bagel et al., 2011; Erythropel, Maric, Nicell, Leask, & Yargeau, 2014; Rose et al., 2012). Ainsi les professionnels de la santé et certains patients peuvent être exposés à des concentrations élevées de DEHP (Bagel et al., 2011; Erythropel et al., 2014; Rose et al., 2012; Shang et al., 2019).

Une étude réalisée sur un échantillon représentatif des femmes américaines, a montré une association positive entre les niveaux urinaires de MEHP et l'IMC (Yaghjyan, Sites, Ruan, & Chang, 2015). Cette étude a aussi mis en évidence, que des rapports métaboliques élevés de MEHP/MEHHP urinaire illustrant un taux de métabolisme oxydatif du MEHP ralenti étaient associés à des IMC et à des tours de tailles élevés. Notons que le Mono-(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phtalate (MEHHP) est un produit de l'oxydation métabolique du MEHP par l'enzyme P450 (voir figure 1) (Yaghjyan et al., 2015). Une étude chez les enfants a montré une corrélation positive entre l'exposition au DEHP avec l'augmentation de la masse corporelle, de l'IMC, du tour de taille

et de l'adiposité (Smerieri et al., 2015). Dans une autre étude, des échantillons urinaires prélevés chez des femmes enceintes entre la 14^e et la 26^e semaine de gestation ont servi à déterminer des concentrations urinaires de DEHP (Harley et al., 2017; Veiga-Lopez, Pu, Gingrich, & Padmanabhan, 2018). Cette étude a permis de montrer que l'exposition des mères au DEHP entre la 14^{ème} et la 26^{ème} semaine de gestation était associée à une augmentation de l'IMC, du tour de taille, du pourcentage de la masse grasse et de la masse corporelle des enfants entre 5 et 12 ans (Harley et al., 2017; Veiga-Lopez et al., 2018). Ceci suggère une relation avec l'épigénétique et les origines développementales de la santé et de la maladie (DOHaD) qui expliquent comment l'exposition à un environnement particulier (DEHP dans le cas de cette étude) tôt dans le développement pourrait impacter les risques de développer des problèmes de santé comme l'obésité plus tard dans la vie (Bianco-Miotto, Craig, Gasser, Van Dijk, & Ozanne, 2017). Les modifications épigénétiques comme la méthylation de l'ADN, la modification des histones et les ARN non-codants sont impliquées dans le fait que l'environnement au début de la vie d'un individu impacte la santé future de ce dernier (Bianco-Miotto et al., 2017). Il a été démontré que l'exposition orale au DEHP entraîne des effets multigénérationnels et transgénérationnel dans le foie de souris au niveau épigénétique par l'altération de la méthylation de l'ADN (Wen, Rattan, Flaws, & Irudayaraj, 2020). Ces effets multigénérationnels et transgénérationnels pourraient être causés par des altérations de l'expression des principales enzymes de l'épigénome à savoir les DNA méthyltransférases (Dnmts) et les méthylcytosines dioxygénases à translocation 10-11 (Tets). Les enzymes Dnmts établissent et maintiennent la méthylation de l'ADN tandis que les Tets sont impliquées dans la déméthylation de l'ADN (Lyko, 2018; Tahiliani et al., 2009). Une étude réalisée sur des souris enceintes exposées à un mélange

contenant du bisphénol A et 2 phtalates dont le DEHP a mis en évidence une augmentation des cas d'obésité parmi les souris mâles et femelles de la 3^e génération (Manikkam, Tracey, Guerrero-Bosagna, & Skinner, 2013). Ceci pourrait s'expliquer par des mécanismes épigénétiques transgénérationnels (Manikkam et al., 2013; Veiga-Lopez et al., 2018).

Il a été montré que le MEHP par ses effets potentiellement obésogènes, stimule l'expression des gènes impliqués dans la glycéronéogenèse, l'absorption, la synthèse et le stockage des triglycérides dans les pré-adipocytes sous-cutanés de femmes (Ellero-Simatos et al., 2011). Les principaux gènes impliqués dans la glycéronéogenèse sont la phosphoénolpyruvate carboxykinase 1 (PCK1) et la pyruvate deshydrogénase kinase 4 (PDK4) (Cadoudal et al., 2008). La glycéronéogenèse est une voie métabolique qui convertit le pyruvate ou le lactate en glycérol-3-phosphate. Le MEHP favoriserait l'accumulation des triglycérides dans les adipocytes différenciés, en altérant le métabolisme des acides gras (MAG) par la stimulation de la glycéronéogenèse et la réestérification des acides gras (AG) non estérifiés. Les études sur les animaux et *in vitro* associent l'exposition au DEHP à une augmentation du tissu adipeux, une augmentation des lipides ou des triglycérides dans la circulation sanguine, et une augmentation de la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes (Veiga-Lopez et al., 2018). L'exposition des lignées cellulaires de pré-adipocytes murins 3T3-L1 à des concentrations de DEHP et de MEHP comprises entre 1 et 100 µM favoriseraient leur différenciation en adipocytes (Chiang et al., 2016). Le mécanisme serait que le DEHP et le MEHP pourraient chacun activer les proliférateurs de peroxyosomes γ (PPAR γ), des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des cellules adipeuses (adipogenèse) (Chiang et al., 2016). Les PPAR sont des facteurs de transcriptions impliqués dans la régulation du métabolisme des AG (Wolfrum, 2007). Selon le

même mécanisme, l'exposition des murins au DEHP/MEHP au cours de la période périnatale favoriserait la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes à des stades précoces du développement; ce qui serait associé à l'obésité de la progéniture (Hao, Cheng, Guo, Xia, & Ma, 2013; Wassenaar & Legler, 2017).

L'étude de Chiang a également montré que le MEHP altère le métabolisme énergétique des cellules adipeuses et la chaîne de transport des électrons aussi appelée respiration mitochondriale. Il faut noter que la β -oxydation des acides gras (AG) et la chaîne de transport des électrons mitochondriales sont des voies interreliées impliquées dans la bioénergétique cellulaire des eucaryotes (Wang et al., 2019). Le DEHP pourrait causer une hypothyroïdie chez les souris avec pour conséquences le déséquilibre du métabolisme énergétique et l'augmentation du tissu adipeux blanc (Lv et al., 2016). Cependant, la majorité des études sur les effets du MEHP est réalisée sur les cellules adipeuses et hépatiques. L'affinité du MEHP pour le récepteur des proliférateurs de peroxyosomes γ (PPAR γ) a été comparée entre 3 lignées cellulaires (cellules C2C12, COS7 et HeLa) (Feige et al., 2007). Des affinités différentes du MEHP pour le récepteur PPAR γ ont été observées entre ces 3 lignées. Parmi ces dernières, cette affinité était la plus élevée dans les C2C12 (lignée de cellules musculaires squelettiques) et était estimée à 80% en comparaison au rosiglitazone, l'agoniste de référence. Il faut cependant noter que les PPAR α sont majoritaires dans le muscle squelettique (Wolfrum, 2007). Les PPAR α stimulent les gènes impliqués dans la β -oxydation (Nakamura, Yudell, & Loor, 2014; Wolfrum, 2007). Le MEHP serait donc un agoniste partiel capable d'activer les PPAR γ . De plus, les récepteurs de l'isoforme PPAR γ 1 d'humains et de souris, sont activés avec des affinités et efficacités au MEHP similaires dans les

cellules de C2C12 (Feige et al., 2007). Ce qui fait de la lignée cellulaire murine C2C12 un bon modèle pour cette recherche (Murphy, Kiely, Jakeman, Kiely, & Carson, 2016).

Les cellules myoblastiques C2C12 (cellules musculaires non différenciées) peuvent, dans certaines conditions expérimentales fusionner entre elles pour former les myotubes (cellules plurinuclées) (Robelin, 1990). Ainsi, nos expériences ont été faites à partir des myoblastes afin de comprendre l'effet du MEHP à ce 1er stade de formation des fibres musculaires squelettiques. Le muscle squelettique qui représente 40% de la masse corporelle d'un individu adulte en santé, est l'un des principaux tissus à utiliser les AG comme source d'énergie (Frontera & Ochala, 2015). Pour se faire, la présence des protéines ACSL est nécessaire (Soupene & Kuypers, 2008). En effet, chez les mammifères comme les humains et les souris, les protéines ASCL jouent un rôle essentiel dans la régulation du métabolisme des AG à longues chaînes (AGLC) en les estérifiant en acyl-CoA, qui seront ensuite utilisés dans l'accumulation des lipides ou la β -oxydation pour la production d'énergie (Soupene & Kuypers, 2008). À cette étape, il est important de comprendre le métabolisme des AGLC dans le muscle squelettique.

1.4 Le métabolisme des acides gras (MAG) à longues chaînes dans le muscle squelettique

1.4.1 Les acides gras

Les AG sont des chaînes hydrocarbonées avec un groupe carboxyl terminal: $\text{CH}_3\text{-CH}_2(\text{n})\text{-COOH}$ (Figure 2) (Adeva-Andany, Carneiro-Freire, Seco-Filgueira, Fernández-Fernández, & Mouriño-Bayolo, 2019).

Les sources des AG sont les triglycérides (TG) endogènes issus des adipocytes et les TG exogènes issus de l'alimentation (Rasmussen & Wolfe, 1999; De Lonlay, Djouadi, Bonnefont, Saudubray, & Bastin, 2002).

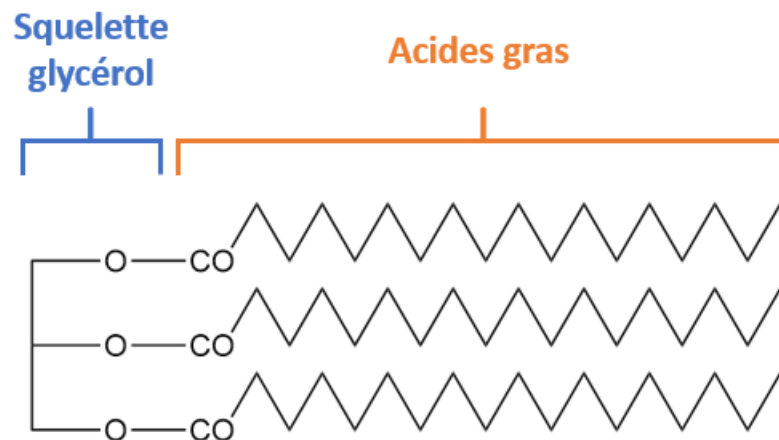


Figure 2: Structure d'un triglycéride

Les AGLC sont des AG dont la formule chimique comprend entre 12 à 20 carbones (Frontera & Ochala, 2015; Adeva-Andany et al., 2019).

Le MAG comprend principalement:

- La β -oxydation des AG pour produire de l'énergie. Il existe 3 types de β -oxydations. Ce sont la β -oxydation mitochondriale qui est majoritaire mais aussi l'oxydation microsomale et péroxisomale (Morales, Bucarey, & Espinosa, 2017; De Lonlay et al., 2002).
- L'accumulation des lipides au repos sous la forme des triacylglycérides (Morales et al., 2017; De Lonlay et al., 2002).

1.4.2 Le muscle squelettique

Le muscle squelettique est l'un des principaux tissus à utiliser ces AGLC comme source d'énergie au repos ou au cours d'un effort prolongé (Frontera & Ochala, 2015; Rasmussen & Wolfe, 1999). Lorsque l'effort n'est pas prolongé ce sont les glucides qui sont privilégiés (Kiens & Roepstorff, 2003).

1.4.3 Sources des AG impliqués dans le MAG et la lipolyse

L'apport des AG circulants aux muscles squelettiques est augmenté à la suite d'un repas gras, mais aussi pendant l'exercice aérobie et la récupération après l'exercice (Fritzen, Lundsgaard, & Kiens, 2020).

Dans le muscle squelettique, les AG utilisés pour le métabolisme ont plusieurs sources. Ils proviennent de:

- l'hydrolyse médiée par la lipoprotéine lipase musculaire (mLPL) des TG présents dans les VLDL (Very Low-Density Lipoprotein) et les chylomicrons circulants exogènes issus de l'alimentation (Fritzen et al., 2020; Rasmussen & Wolfe, 1999; De Lonlay et al., 2002). Il faut noter que les TG étant insolubles dans le plasma, sont empaquetés sous forme de particules lipoprotéiques telles que les VLDL et les chylomicrons pour être transportés vers le tissu adipeux et les muscles squelettiques (Rahmany & Jialal, 2021). Les chylomicrons et les VLDL sont synthétisés respectivement dans l'intestin et le foie (Feingold, 2021).

- la lipolyse des triglycérides stockés dans le tissu adipeux et le muscle (Fritzen et al., 2020; De Lonlay et al., 2002; Morales et al., 2017).

La lipolyse est le processus par lequel les TG sont dégradés en AG libres et en glycérol (De Lonlay et al., 2002; Morales et al., 2017). Il existe 3 enzymes responsables de la lipolyse au niveau du muscle et du tissu adipeux. Ce sont les monoacylglycérol lipases, les adipose triglycéride lipases (ATGL), et les hormone-sensitive lipases (HSL) (Morales et al., 2017). La lipolyse est stimulée par les agonistes β -adrénergiques et l'exercice (Morales et al., 2017).

1.4.4 Absorption des AG au niveau des fibres musculaires squelettiques

Dans le plasma, les AG non-estérifiés issus du tissu adipeux sont liés en majorité à l'albumine à cause de leur caractère hydrophobique (Fritzen et al., 2020; Van Der Vusse, 2009). Ces AG liés à l'albumine, ainsi que ceux présents dans les chylomicrons et les VLDL sous la forme de TG sont déplacés du plasma vers l'intérieur du muscle en traversant le sarcolemme (membrane plasmique de la fibre musculaire squelettique) par diffusion passive mais aussi grâce à des protéines stimulées par l'insuline et la contraction (Fritzen et al., 2020; Hotamisligil & Bernlohr, 2015; Morales et al., 2017). Ce sont les FA translocases, les protéines de transport des AG (FATP) et les protéines liant les AG (FABP) qui facilitent l'entrée des AG dans les fibres musculaires à travers le sarcolemme (Morales et al., 2017).

Parmi les FA translocases, il y a les Cluster of Differentiation (CD36) qui sont augmentées dans le sarcolemme après la contraction musculaire. Les AG peuvent aussi être transportés dans les myocytes par endocytose médiée par les CD36 (voir figure 3) (Glatz & Luiken, 2018). Rappelons que l'endocytose permet de transporter des molécules de grandes tailles ou celles pour lesquelles il est difficile de traverser le sarcolemme (Doherty & McMahon, 2009). Le taux d'absorption cellulaire des AG est principalement contrôlé par la présence de CD36 à la surface

de la cellule, qui est régulée par le recyclage vésiculaire subcellulaire de CD36 des endosomes vers la membrane plasmique (Glatz & Luiken, 2018). Parmi les FATP prédominantes dans le muscle squelettique il y a les FATP1, FATP4 et FATP6 (Figure 3) (Morales et al., 2017). Les FATP1 sont présentes dans les tubules T, leur surexpression favorise l'oxydation. Les FATP4 sont augmentées dans le sarcolemme après la contraction musculaire (Morales et al., 2017). FATP1 et 4 sont stimulées par l'insuline pour favoriser les translocations vers les tubules. Ce qui entraîne une augmentation de l'absorption des AG (Morales et al., 2017). Il n'y a pas assez d'informations sur le FATP6 au niveau du muscle squelettique. Cette protéine est présente dans le muscle squelettique mais n'est pas sensible à la contraction musculaire et l'insuline (Jain et al., 2009). Cependant, elle est exprimée en majorité dans le muscle cardiaque (Doerge & Stahl, 2005; Gimeno et al., 2003). La protéine FATP6 est localisée au niveau du sarcolemme des cardiomyocytes adjacents aux petits vaisseaux sanguins (Gimeno, 2007). La FATP6 est impliquée dans l'absorption des AGLC dans les cardiomyocytes (Doerge & Stahl, 2005; Gimeno et al., 2003).

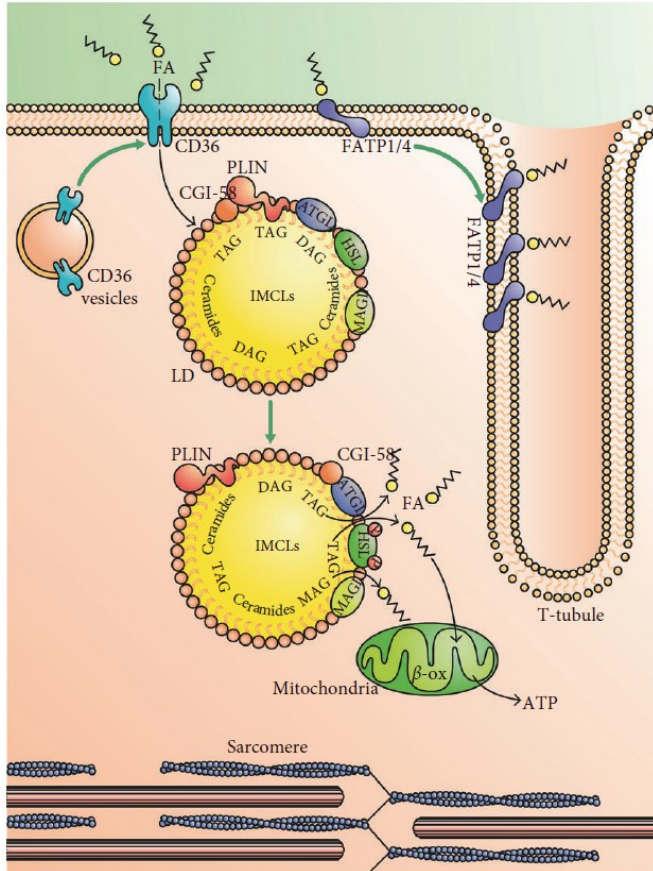


Figure 3: Localisation des CD36, FATP et composition des gouttelettes lipidiques (LD) dans le muscle squelettique (Morales et al., 2017)

Muscle Lipid Metabolism: Role of Lipid Droplets and Perilipins (Morales et al., 2017) Copyright© Creative Commons Attribution License <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Il existe 2 groupes de FABP. Ce sont les FABPpm associées à la membrane cellulaire et les FABPc qui sont présentes dans le cytosol. Les FABPpm fonctionnent en association avec les CD36 pour transporter les AG dans les cellules musculaires (voir figure 4) (Fritzen et al., 2020). Les FABPc fonctionnent comme des navettes cytosoliques des AG servant de ligands pour activer les récepteurs nucléaires activés par les PPAR (Wolfrum, 2007) (Figure 5).

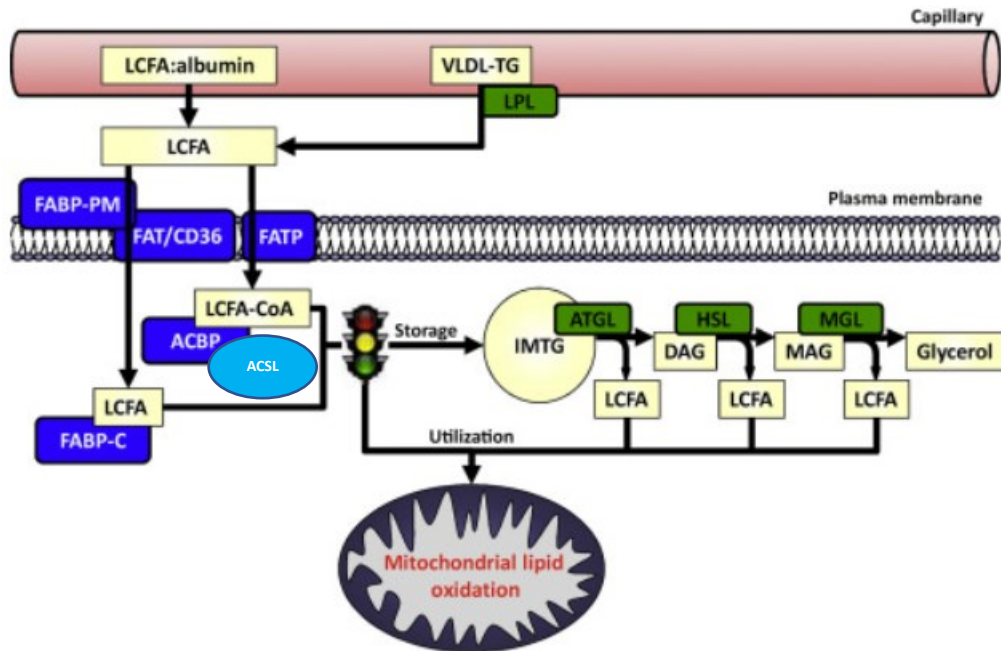


Figure 4: Principales protéines impliquées dans l'absorption, le transport et la lipolyse des AG au cours de leur métabolisme

Exercise and Regulation of Lipid Metabolism (Noland, 2015) Copyright © Numéro de Licence:

5443250947168

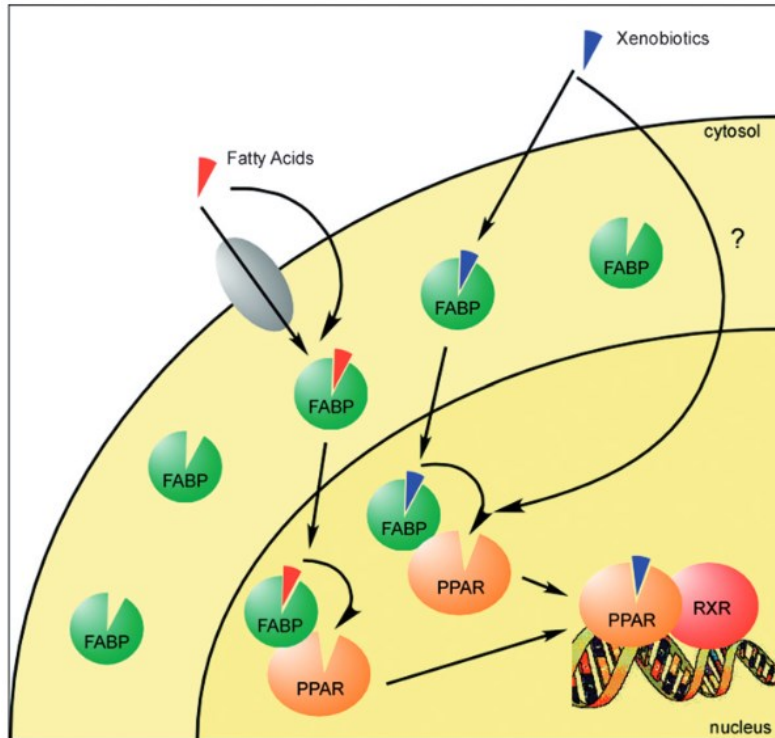


Figure 5: Le rôle des FABPc au niveau des PPAR dans les cellules musculaires squelettiques

Cytoplasmic fatty acid binding protein sensing fatty acids for peroxisome proliferator activated receptor activation (Wolfrum, 2007) Copyright© Numéro de licence: 5443160371380

1.4.5 La régulation du MAG dans le muscle squelettique

Dans les fibres squelettiques, en fonction du statut métabolique des cellules et des conditions de repos ou d'exercice, état nourri ou état à jeun, les AG seront dirigés vers:

-la β -oxydation mitochondriale au cours de l'exercice et l'état de jeun. C'est-à-dire au cours de la baisse du rapport glucagon/insuline

-l'accumulation des lipides au repos et à l'état nourri c'est-à-dire au cours d'une augmentation du rapport glucagon/insuline (De Lonlay et al., 2002).

1.4.6 Les Acyl-CoA Synthétases Longue Chaîne (ACSL)

Les protéines ACSL jouent un rôle essentiel dans la régulation du MAG à longues chaînes en estérifiant ces AG en acyl-CoA, utilisés dans l'accumulation des lipides ou dans la β -oxydation pour la production d'énergie (Soupene & Kuypers, 2008). Chez les mammifères comme les humains et les souris, il existe 5 isoformes d'ACSL (Soupene & Kuypers, 2008). Ce sont les protéines ACSL 1, ACSL 3, ACSL4, ACSL 5 et ACSL 6 (Soupene & Kuypers, 2008). Il existe 5 gènes différents qui produisent chacune des 5 isoformes d'ACSL qui ont des structures assez similaires (Soupene & Kuypers, 2008). Les ACSL1, 5, 6 partagent plus de 60 % d'identités au niveau des acides aminés (Oikawa et al., 1998). Les ACSL3 et 4 partagent 68 % d'identité entre elles et ont 30 % d'homologie avec l'ACSL1 (Kang et al., 1997).

Les variations entre chacune des isoformes proviennent des différences dans les régions 5'-UTR, le 1er exon codant, les exons codants alternatifs et deux motifs échangeables situés à proximité du site de liaison de l'ATP (Soupene & Kuypers, 2008).

Ces isoformes diffèrent dans leur distribution tissulaire, leur localisation subcellulaire, leur expression relative, leur cinétique enzymatique, leur régulation et leur préférence de substrat (Coleman, Lewin, & Muoio, 2000; Coleman, Lewin, Van Horn, & Gonzalez-Baró, 2002; Lewin, Kim, Granger, Vance, & Coleman, 2001; Lewin, Van Horn, Krisans, & Coleman, 2002). La plupart des ACSL sont des protéines membranaires intrinsèques (Cao, Murphy, McIntyre, Zimmerman, & Prescott, 2000; De Jong, Neal, Coleman, & Lewin, 2007).

Ces protéines sont présentes dans le foie, le tissu adipeux, le cerveau et/ou le muscle squelettique entre autres (Soupene & Kuypers, 2008). Les ACSL1, 3 et 6 seraient plus abondantes que les ACSL4 et 5 dans le muscle squelettique des rats (Mashek, Li, & Coleman, 2006). Selon le tissu dans lequel sont présentes certaines isoformes et selon leurs localisations subcellulaires, les ACSL dirigent les acyl-CoA vers la β -oxydation ou vers l'accumulation des lipides selon le concept de "channeling" (Lewin et al., 2001).

Il est dit dans la littérature que les ACSL présentes dans la mitochondrie favoriseraient la β -oxydation tandis que celles présentes dans le réticulum endoplasmique (RE) favoriseraient l'accumulation des lipides (Digel, Eehalt, Stremmel, & Füllekrug, 2009; Rajkumar et al., 2018). Ce n'est pas si simple. Par exemple les ACSL1 dans le foie favorisent l'accumulation des lipides alors que les ACSL1 dans le muscle et le cœur favorisent la β -oxydation (Teodoro et al., 2017). Au niveau du muscle squelettique de souris, les ACSL1 sont situées sur la membrane externe de la mitochondrie (Li et al., 2015). Au niveau des hépatocytes, on les retrouve à la fois dans le RE et la mitochondrie (Fujimoto et al., 2007).

Au niveau des hépatocytes de rats, la localisation subcellulaire des ACSL1 qui sont les plus étudiées varie d'une étude à l'autre (Digel et al., 2009). De plus, il existe des phénomènes de compensation de leurs activités entre les 5 isoformes d'ACSL.

Notre étude s'intéresse particulièrement aux ACSL4 car ces protéines ont une sélectivité de substrat pour les AG polyinsaturés tel que l'acide arachidonique (AA) dont l'augmentation dans le plasma de femmes souffrant d'obésité a été associée à des concentrations urinaires élevées de MEHP (Chen et al., 2021; Rajkumar et al., communication personnelle).

➤ ACSL4

Les tissus les plus riches en ACSL4 chez les souris sont le placenta et les surrénales mais on les retrouve aussi dans le muscle squelettique, le foie et le tissu adipeux (NCBI, 2022e). Chez l'humain, ces protéines sont plus abondantes dans les surrénales, et l'appendice mais on les retrouve aussi dans d'autres tissus comme le placenta et le muscle squelettique (NCBI, 2022f). Il existe 2 isoformes d'ACSL4 de 670 et 711 acides aminés chez la souris et 3 isoformes de 670, 711 et 717 acides aminés chez l'humain (NCBI, 2022e, 2022f). Les ACSL4 seraient impliquées dans la conversion de l'AA en arachidonyl-CoA qui peut ensuite être utilisé dans la β -oxydation (Kang et al., 1997; Soupene & Kuypers, 2008; Xu et al., 2012). Les ACSL4 seraient aussi impliquées dans le transport du cholestérol entre le RE et la mitochondrie, le stockage intracellulaire des lipides et la régulation de l'incorporation de l'AA dans les phospholipides (Kang et al., 1997; Xu et al., 2012). Notons que la régulation de l'AA et ses métabolites est le processus qui contrôle les voies de signalisations dans lesquelles l'AA et ses métabolites sont impliqués (Patel & Harris, 2016). Il existerait des sites de reconnaissance pour PPAR α et PPAR γ dans le promoteur des ACSL4 chez la souris aux positions 181-187; 612-618 pour PPAR α et 340-351; 565-576 et 622-633 pour PPAR γ selon les logiciels PROMO et PASTAA (Farré et al., 2003; Messeguer et al., 2002; Roider et al., 2009). Chez le rat, il a été mis en évidence que la quantité d'ARNm des ACSL4 pouvait être influencée par la nutrition. Leur quantité augmentait dans le muscle gastrocnémien des rats à jeun. Mais une fois ces rats nourris, la quantité d'ARNm des ACSL4 diminuait (Mashek et al., 2006). L'augmentation des niveaux d'ARNm des ACSL4 aurait pour but de favoriser la β -oxydation pour produire plus d'énergie chez les rats en état de jeun. Ceci suggère que les ACSL4 dans le muscle squelettique favoriseraient la β -oxydation. Cependant dans cette étude, la quantité des

protéines ACSL4 dans le muscle gastrocnémien était insuffisante pour être détectée par l'anticorps utilisé (Mashek et al., 2006). Dans le contexte des diètes qui induisent l'obésité chez le rat, il a été démontré que les ACSL4 présentes dans le tissu adipeux blanc gonadique modulent l'AA parmi les AG libres et les incorporent dans les phospholipides (Killion et al., 2018). Cela signifie que les ACSL4 contrôlent la quantité d'AA à utiliser parmi les AG afin de les incorporer dans les phospholipides. Par contre, une étude sur les adipocytes de rat, avec une ablation des ACSL4 montre une réduction de la masse corporelle de 16%, ainsi qu'une réduction significative de 35% de la masse grasse par rapport aux contrôles (Killion et al., 2018). Ceci suggère que l'augmentation de l'expression des ACSL4 favoriserait l'obésité. Dans cette logique, une étude sur le tissu adipeux intramusculaire du porc a montré que la surexpression des ACSL4 dans ce tissu entraîne une augmentation de l'adipogenèse et de l'accumulation des lipides dans les préadipocytes intramusculaires porcins (Ren et al., 2022). L'ACSL4 est la seule isoforme des ACSL, dont l'activité enzymatique est directement inhibée par la classe de médicaments anti-diabétiques thiazolidinediones par un mécanisme différent de celui des PPAR γ (Kim, Lewin, & Coleman, 2001). Ceci s'explique par le fait que le thiazolidinedione est un puissant inhibiteur spécifique des ACSL4 (Kim et al., 2001).

La protéine suivante est l'ACSL5 dont les quantités varient avec la concentration de MEHP et dont il est question avec l'ACSL4 dans le manuscrit en annexe.

➤ ACSL5

Les tissus riches en ACSL5 chez les souris sont le foie et le gros intestin mais on le retrouve aussi dans le muscle squelettique et le tissu adipeux (NCBI, 2022g). Chez l'humain, ces protéines sont abondantes dans le petit intestin et le duodénum mais on les retrouve aussi dans le muscle squelettique, le foie, le gros intestin (Kwak, et al., 2019; NCBI, 2022h). Les rongeurs, ont une protéine ACSL5 de 683 acides aminés alors que les humains en ont 3 (NCBI, 2022g, 2022h; Soupene & Kuypers, 2008). L'isoforme longue possède 739 acides aminés tandis que l'isoforme moyenne en a 715 et la courte en a 683 (NCBI, 2022h; Soupene & Kuypers, 2008). La concentration des ACSL5 dans les cellules C2C12 est 3 fois plus élevée dans le RE que dans la mitochondrie (Rajkumar et al., 2018). L'isoforme courte humaine est principalement localisée dans la mitochondrie contrairement à l'isoforme longue qui est principalement localisée dans le RE (Rajkumar et al., 2018). Kwak et al. mentionnent que les protéines ACSL5 sont localisées dans la mitochondrie des muscles squelettiques de souris et d'humains (Kwak et al., 2019). Il semblerait que l'étude de Kwak et al. se soit intéressée à l'isoforme courte qui est commune aux 2 espèces et la plus abondante chez l'humain (Rajkumar et al., 2018). Il existerait des sites de reconnaissance pour PPAR α dans le promoteur des ACSL5 chez la souris aux positions 73-79; 435-441 et 535-545 selon les logiciels PROMO et PASTAA (Farré et al., 2003; Messeguer et al., 2002; Roider et al., 2009). Il existerait également des sites de reconnaissance pour PPAR γ dans le promoteur des ACSL5 chez l'humain (Adamo et al., 2007). Dans le foie de la souris, l'ablation des protéines ACSL5 augmente la dépense énergétique du corps entier et retarde l'absorption des AG (Bowman et al., 2016), ce qui suggère que les ACSL5 favorisent la synthèse des lipides au niveau du foie de souris. Une étude dans notre laboratoire, sur des myoblastes de C2C12 exposés

au MEHP, a montré une réduction significative des quantités des protéines ACSL5 particulièrement entre 10 et 100 μM de MEHP (Rajkumar et al., communication personnelle en annexe). Dans cette même étude, il a été démontré qu'une exposition des myoblastes squelettiques de C2C12 à des concentrations croissantes de MEHP entraînait une réduction des niveaux d'oxydation des AG et de la respiration mitochondriale (Rajkumar, et al., communication personnelle en annexe). Ces résultats mettent en évidence que les ACSL5 sont impliquées dans la régulation de l'oxydation mitochondriale des AG dans le muscle squelettique de souris. Il en est de même au niveau du muscle squelettique humain (Kwak et al., 2019; Rajkumar et al., 2018; Rajkumar et al., communication personnelle en annexe).

➤ **ACSL1**

Les tissus riches en ACSL1 chez les souris sont le foie, la graisse sous-cutanée et le cœur mais on les retrouve aussi dans le muscle squelettique (NCBI, 2022a). Chez l'humain, ces protéines sont abondantes dans la graisse et le foie mais on les retrouve aussi dans le muscle squelettique et cœur (NCBI, 2022b; Teodoro et al., 2017). Par exemple les ACSL1 dans le foie favorisent la synthèse des lipides alors que les ACSL1 dans le muscle et le cœur favorisent la β -oxydation (Teodoro et al., 2017). Ainsi dans les tissus fortement oxydatifs comme les muscles squelettiques et le cœur, les acyl-CoA destinés à l'oxydation des AG peuvent être synthétisés par les ACSL1 entre autres (Teodoro et al., 2017). Il existe 2 isoformes de protéines ACSL1 chez la souris dont une de 374 acides aminés et l'autre de 699 acides aminés (NCBI, 2022a). L'humain a 4 isoformes d'ACSL1 de 634, 649, 664 et 698 acides aminés (NCBI, 2022b). Il existerait des sites de reconnaissance pour PPAR α et PPAR γ dans le promoteur des ACSL1 chez la souris aux positions

464-470; 583-593 pour PPAR α et 350-361; 414-425 pour PPAR γ selon les logiciels PROMO et PASTAA (Farré et al., 2003; Messeguer et al., 2002; Roider et al., 2009). Chez le rat, il a été mis en évidence que la quantité de ACSL1 pouvait être influencée par la nutrition (Mashek et al., 2006). Leur quantité augmentait dans le muscle gastrocnémien des rats à jeun. Mais une fois ces rats nourris, la quantité d'ACSL1 n'était pas modifiée par rapport à celle de l'état à jeun. Cependant, le niveau de leur ARNm augmentait en réponse au jeûne et diminuait une fois qu'ils étaient nourris (Mashek et al., 2006). Une étude sur les souris a montré que l'ablation des ACSL1 dans les muscles squelettiques de souris (muscle gastrocnémien) entraîne une réduction importante de l'activité des ACSL et l'oxydation des AG (Li et al., 2015; Zhao et al., 2019). Cette étude a aussi mis en évidence des niveaux d'ARNm d'ACSL3 1,5 fois plus élevés dans les muscles de souris sans ACSL1 par rapport aux contrôles. Malgré cette compensation par un niveau élevé d'ARNm d'ACSL3, l'activité totale des ACSL dans les muscles gastrocnémiens sans ACSL1 avait baissé de 90%. Ce qui indique une compensation minimale des ACSL3. Cette ablation d'ACSL1 entraîne une réduction du taux d'oxydation des AG de 90% et 77% respectivement dans les muscles gastrocnémiens rouges et blancs de souris (Zhao et al., 2019). Au niveau du cœur adulte de souris, les ACSL1 contribuent considérablement à l'activation des AG à longues chaînes (De Jong et al., 2007).

➤ ACSL3

Les ACSL3 au niveau du muscle squelettique ont été moins étudiées dans la littérature. Les tissus riches en ACSL3 chez les souris sont le cortex, le lobe frontal et le cervelet (NCBI, 2022c). Les ACSL3 sont présentes dans les muscles squelettiques de souris (Stierwalt, Ehrlicher, Robinson, &

Newsom, 2020). Chez l'humain, ces protéines sont abondantes dans la prostate et le cerveau mais leur présence n'a pas été étudiée dans le cortex, le lobe frontal et le cervelet en particulier (NCBI, 2022d). Il existe 2 isoformes d'ACSL3 chez les souris dont une de 568 acides aminés et une de 720 (NCBI, 2022c). L'humain possède une seule isoforme de 720 acides aminés (NCBI, 2022d). Il existerait des sites de reconnaissance pour PPAR α et PPAR γ dans le promoteur des ACSL3 chez la souris aux positions 831-837 pour PPAR α et 350-361; 463-474 pour PPAR γ selon les logiciels PROMO et PASTAA (Farré et al., 2003; Messeguer et al., 2002; Roider et al., 2009). Nous n'avons pas d'information sur la présence des ACSL3 dans le muscle squelettique humain. Une étude sur des hépatocytes primaires de rats, a montré que l'ablation des ACSL3 entraînait une réduction de l'activité des gènes rapporteurs pour certains facteurs de transcription lipogéniques comme les PPAR γ qui contrôlent le métabolisme énergétique hépatique comparé aux contrôles sans ablation d'ACSL3 (Bu, Mashek, & Mashek, 2009). Cette étude a montré que l'ablation des ACSL3 au niveau des hépatocytes primaires de rats supprime la lipogenèse. Ceci suggère que les ACSL3 régulent la lipogenèse *de novo* au niveau des hépatocytes de rats. La lipogenèse *de novo* est un processus biochimique de la synthèse des acides gras à partir des acétyl-CoA issus de différentes voies cellulaires dont le catabolisme des glucides (Sanders & Griffin, 2016). Il a été montré que cette ablation d'ACSL3 réduisait l'activité totale des ACSL sans affecter de manière importante l'expression des ACSL 1, 4 et 5 suggérant que l'absence d'ACSL3 n'est pas compensée (Bu et al., 2009). Au niveau du cœur embryonnaire et post-natal immédiat de souris, les ACSL3 contribueraient considérablement à l'activation des AGLC (De Jong et al., 2007). Cependant, entre la β -oxydation et l'accumulation des lipides nous ne savons pas vers quelle voie métabolique les acyl-CoA produits par les ACSL3 du cœur embryonnaire et post-natal immédiat

de souris sont dirigés. Les protéines ACSL3 sont localisées dans le RE et les gouttelettes lipidiques (LD) au niveau des hépatocytes HUH7 chez l'humain (Fujimoto et al., 2007). On les retrouve aussi au niveau des LD dans les cellules C2C12 (Stierwalt et al., 2020; Tan, Jin, Zhao, Wu, & Ren, 2021).

➤ ACSL6

Les tissus riches en ACSL6 chez les souris sont le cervelet et le cortex mais on les retrouve en faible quantité dans le muscle squelettique, le foie et le tissu adipeux (NCBI, 2022i). Chez l'humain, ces protéines sont abondantes dans le cerveau et les testicules; on les retrouve aussi dans le muscle squelettique mais leur présence n'a pas été étudiée dans le cervelet et le cortex en particulier (NCBI, 2022j; Teodoro et al., 2017). Les rongeurs, ont une protéine ACSL6 de 683 acides aminés alors que les humains ont 3 isoformes distinctes localisées dans la membrane plasmique des cellules (Soupene, Dinh, Siliakus, & Kuypers, 2010). Nous n'avons pas d'information sur le nombre d'acides aminés au niveau des 3 isoformes d'ACSL6 chez l'humain. Dans le muscle squelettique de rats et d'humains, les ACSL6 favoriseraient l'accumulation des AG (Teodoro et al., 2017). Il existerait des sites de reconnaissance pour PPAR α dans le promoteur des ACSL6 chez la souris aux positions 401-407; 648-654; 656-662; 809-815; 831-837 pour PPAR α selon les logiciels PROMO et PASTAA (Farré et al., 2003; Messeguer et al., 2002; Roider et al., 2009). Dans les muscles squelettiques de femmes et de rats, l'exercice et le jeûne réduisent l'expression des ARNm des ACSL6; l'ingestion des lipides augmentent l'expression des ARNm des ACSL6; l'inhibition génique des ACSL6 dans les myotubes primaires des rats réduit l'accumulation des lipides et active la capacité d'oxydation mitochondriale (Teodoro et al., 2017). La surexpression des ACSL6 dans les myotubes primaires humains augmente le niveau des

phospholipides et diminue le métabolisme oxydatif (Teodoro et al., 2017). Cette étude montre que les ACSL6 dirigent les acyl-CoA vers l'accumulation des AG tandis que leur réduction favorise la respiration mitochondriale et l'oxydation des lipides (Teodoro et al., 2017).

1.4.7 Compensation/synergie de l'activité des ACSL dans le muscle squelettique de souris

Plusieurs facteurs comme l'alimentation et l'exercice peuvent modifier le fonctionnement et/ou la quantité des ACSL dans le muscle squelettique (Stierwalt et al., 2020). Dans une étude, les effets de l'alimentation riche en gras et de l'exercice aérobique sur les isoformes d'ACSL1, 4, 5 et 6 ont été mis en évidence au niveau du muscle gastrocnémien de souris mâles (Stierwalt et al., 2020). Cette étude n'a pas permis de détecter les ACSL3 au niveau du muscle gastrocnémien de souris bien que leur présence ait été mise en évidence au niveau des myotubes de C2C12 (Stierwalt et al., 2020). L'alimentation riche en gras a entraîné une augmentation des concentrations d'ACSL1 et 6 ; mais est sans effet sur les ACSL4 et 5. Nous n'avons pas d'information sur la composition en AA de cette alimentation riche en gras. L'exercice aérobique a entraîné une augmentation des concentrations en ACSL6 chez les souris avec une alimentation pauvre en gras. Peu importe le type d'alimentation, l'exercice entraîne une réduction des concentrations en ACSL4 et est sans effet sur les ACSL 1 et 5. Aussi, le type d'alimentation n'avait pas d'influence sur les niveaux d'ARNm d'ACSL1, tandis que l'exercice entraînait une augmentation des niveaux d'ARNm d'ACSL1 dans le muscle squelettique des souris dont l'alimentation était riche en gras (Stierwalt et al., 2020). Le résumé de la synergie et des

phénomènes de compensation de l'activité des ACSL expliqué dans ce paragraphe se trouve dans les tableaux 1 et 2 respectivement.

Tableau 1: Résumé de la synergie de l'activité des ACSL dans le muscle squelettique de souris

	Causes	Variation de l'expression
ACSL1	Repas gras/exercice Exercice+Repas gras	↑/↔ protéines ↑ARNm
ACSL3	Ablation ACSL1	↑ ARNm d'ACSL3
ACSL4	Repas gras/exercice	↔ /↓ protéines
ACSL5	Repas gras/exercice	↔/↔ protéines
ACSL6	Repas gras/ exercice+repas pauvre en gras	↑/↑ protéines

Tableau 2: Résumé des phénomènes de compensation de l'activité de certaines ACSL

	Tissus et espèces	Causes	Compensation
ACSL1	Muscles squelettiques de souris	Ablation ACSL1	Compensée par ↑ ARNm des ACSL3
ACSL3	Hépatocytes primaires de rats	Ablation ACSL3	Non compensée

Étant donné que l'alimentation riche en gras et l'exercice aérobique modifient le fonctionnement et/ou la quantité des ACSL, il pourrait en être de même pour les effets du MEHP sur les ACSL.

Retenons que les ACSL jouent un rôle essentiel dans la régulation du MAG à longues chaînes en estérifiant ces AGLC en acyl-CoA, utilisés dans la β -oxydation pour la production d'énergie ou dans l'accumulation des lipides (Soupene & Kuypers, 2008). Il est donc important de bien comprendre la β -oxydation et l'accumulation des lipides ainsi que les principales protéines impliquées.

1.4.8 La β -oxydation

La β -oxydation comprend 2 étapes principales. Ce sont: le transport mitochondrial des AGLC et l'oxydation intra-mitochondriale des AGLC (De Lonlay et al., 2002).

➤ Le transport mitochondrial des AG à longue chaîne

Ce transport des acyl-CoA à chaîne longue commence dans le cytoplasme, par l'activation en acyl-CoA, catalysée par les ACSL (De Lonlay et al., 2002). Le transfert de ces AG dans la mitochondrie se fait par l'action concertée de la carnitine, la carnitine-palmitoyl transférase 1 (CPT1), l'acylcarnitine translocase et la carnitine-palmitoyl transférase 2 (CPT2). La carnitine et la carnitine-palmitoyl transférase 1 (CPT1) sont situées dans la membrane externe de la mitochondrie tandis que l'acylcarnitine translocase et la carnitine-palmitoyl transférase 2 (CPT2)

sont situées dans la membrane interne de la mitochondrie (Figure 6) (De Lonlay et al., 2002; Virmani et al., 2015).

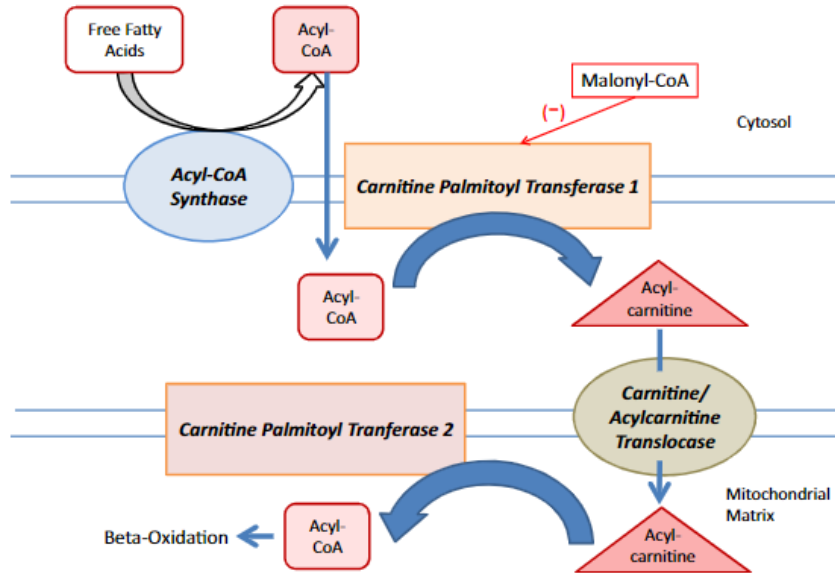


Figure 6: Localisation des protéines impliquées dans le transport mitochondrial des AG à longue chaîne (Virmani et al., 2015)

The Carnitine Palmitoyl Transferase (CPT) System and Possible Relevance for Neuropsychiatric and Neurological Conditions (Virmani et al., 2015) Copyright© Numéro de licence: 5443170328554

➤ L'oxydation intra-mitochondriale

Dans la matrice mitochondriale, les acyl-CoA sont oxydés en acétyl-CoA par une séquence de quatre réactions enzymatiques (hélice de Linnen) (Figure 7) (De Lonlay et al., 2002).

À chaque tour d'hélice, un résidu acétyl-CoA est libéré. Ces 4 réactions sont :

-la déshydrogénation par une acyl-CoA déshydrogénase avec le flavine-adénine dinucléotide (FAD) comme cofacteur, issue de la vitamine B (riboflavine). La déshydrogénation fait intervenir un système de transport d'électrons (ETF). Il existe plusieurs iso-enzymes d'acyl-CoA déshydrogénase dont le VLCAD, chargée des AGLC.

-l'hydratation de la double liaison par une énoyl-CoA hydratase

-la déshydrogénation par la 3-hydroxy-acylCoA déshydrogénase qui a 2 iso-enzymes. Celle spécifique des chaînes longues et courtes est LCHAD

-le clivage par la 3-cétothiolase avec libération d'acétyl-CoA.

Ces 3 dernières activités sont portées par une protéine multi-enzymatique appelée l'enzyme trifonctionnelle (De Lonlay et al., 2002).

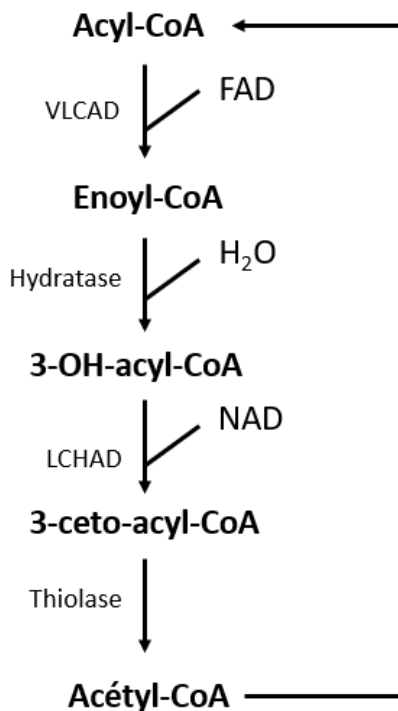


Figure 7: Cycle de la β-oxydation (De Lonlay et al., 2002)

La β -oxydation des AG produit l'acétyl-CoA qui passe à travers le cycle de l'acide citrique pour produire le CO_2 , l' H_2O et l'ATP (Krebs, 1970; Xu et al., 2020).

1.4.9 L'accumulation des lipides

La synthèse des lipides est pratiquement inexistante dans le muscle squelettique, car il n'exprime pas l'enzyme synthase des AG essentielle à la synthèse des lipides (Morales et al., 2017 ; Van Loon et al., 2004 ; Thomson & Winder, 2009). Lorsque l'absorption d'AG dans les fibres squelettiques dépasse l'oxydation des AG, ceci entraîne l'accumulation des lipides intramyocellulaires (IMCL) qui sont composés des TG, des diacylglycérols (DAG), des acyls-CoA à longue chaîne et des céramides (Morales et al., 2017). Les IMCL sont retrouvés entre les sarcomères et près des mitochondries, stockés dans des LD (voir figure 4) (Morales et al., 2017 ; Van Loon et al., 2004 ; Thomson & Winder, 2009). Ces IMCL sont formés à partir de la désaturation ou l'estérification des AG captés dans le plasma (Frayn, Arner, & Yki-Järvinen, 2006; Morales et al., 2017; Pender et al., 2006).

Les TG sont principalement synthétisés dans le muscle par la voie des mono-acylglycérol-diacylglycérol (MAG-DAG), dans laquelle le MAG est réacylé pour former le DAG qui à son tour est acylé pour former les TG (Han, Wang, Fang, & Han, 2013). Les principales enzymes impliquées dans la voie des MAG-DAG sont la monoacylglycérol acyl-transférase (MGAT) et la DAG-O-acyltransférase (DGAT) (Wendel, Lewin, & Coleman, 2009). La MGAT et DGAT sont impliquées respectivement dans le couplage du second et du 3ème AG au squelette glycérol (Wendel et al., 2009). Il existe 3 isoformes de MGAT (1, 2 et 3) principalement localisées au niveau du réticulum endoplasmique (RE) mais il a été démontré que la MGAT2 est aussi localisée au niveau des LD

(Jin, McFie, Banman, Brandt, & Stone, 2014). Il existerait 2 isoformes de DGAT (1 et 2) (Eichmann & Lass, 2015). La DGAT 1 est uniquement localisée sur le RE tandis que la DGAT2 est localisée sur les membranes associées à la mitochondrie et les LD (Kuerschner, Moessinger, & Thiele, 2008; McFie, Banman, Kary, & Stone, 2011). Ceci indique la possible implication des DGAT2 dans la synthèse des TG au niveau des LD en formation (Kuerschner et al., 2008; McFie et al., 2011).

➤ **Les gouttelettes lipidiques**

Les LD sont des organites intracellulaires de type vésicule composés principalement de lipides neutres, y compris des TG et sont présentes entre autres dans le tissu adipeux et le muscle squelettique (Wang, 2016). Les LD interagissent avec plusieurs organelles comme le RE, la mitochondrie, les péroxysomes et le noyau (Tan et al., 2021).

Les LD sont délimités par une monocouche phospholipidique et revêtu protéines appelées périlipines (PLIN) (Morales et al., 2017). Il existe 5 isoformes de PLIN 1 -5 qui jouent un rôle important dans le remplacement des lipides dans les LD (Pourteymour et al., 2015). Les PLIN présentes dans le muscle squelettique sont PLIN 2, 3, 4, 5 (Pourteymour et al., 2015).

Les PLIN 2 favorisent l'absorption des AG permettant une augmentation de la taille des LD (Morales et al., 2017). L'absorption d'AG dans le muscle est accrue, en cas d'excès d'AG plasmatiques comme c'est le cas de l'obésité et du diabète de type 2. Des niveaux plus élevés de PLIN2 favorisent une augmentation de la taille et du nombre de LD (Morales et al., 2017).

Les PLIN 3 se situent au niveau des sites de contact des LD avec les mitochondries favorisant un transfert des AG des LD vers la mitochondrie pour leur oxydation (Morales et al., 2017).

Le rôle des PLIN 4 dans le muscle squelettique n'est pas très clair.

Des niveaux élevés de PLIN5 favorisent la métabolisation des AG dans la mitochondrie (Morales et al., 2017).

Lorsque les LD entrent en contact avec le RE, ceci permet aux membranes phospholipidiques des LD de se lier à la membrane externe du RE (Olzmann & Carvalho, 2019). Des protéines comme la DGAT2 sont transférées du RE à la surface des LD à cause de la fluidité de la membrane qui accélère la croissance des LD et leur permet de stocker plus de lipides (Wilfling et al., 2014). Lorsque les LD entrent en contact avec la mitochondrie, les AG issus des LD sont rapidement transférés à la mitochondrie pour subir la β -oxydation pour produire une grande quantité d'énergie (Rambold, Cohen, & Lippincott-Schwartz, 2015).

Une augmentation des IMCL est souvent associées au vieillissement, à la réduction de la force musculaire et la diminution de la sensibilité musculaire à l'insuline (Morales et al., 2017; Van Loon et al., 2004). Les IMCL ne sont pas toujours liés à l'obésité. Des femmes en santé, peuvent accumuler 57% plus de lipides que les hommes dans le tissu musculaire squelettique, sans être obèse. L'accumulation de LD est souvent présente chez les athlètes d'endurance qui ont un fonctionnement normal de l'insuline (Morales et al., 2017 ; Van Loon et al., 2004). Ces athlètes d'endurance ont la même quantité d'IMCL dans leurs LD de muscle squelettique que les patients atteints de diabète de type 2 (Li et al., 2019). Cependant, leurs LD sont plus petits en volume que les LD du muscle squelettique des patients atteints de diabète de type 2. Ces LD de petit volume chez les athlètes d'endurance confèrent une plus grande surface permettant une plus grande activité de lipolyse. Les LD des athlètes d'endurance peuvent aussi être en contact avec les mitochondries plus que les LD du muscle squelettique des patients atteints de diabète de type 2,

ce qui fournit l'énergie nécessaire au muscle squelettique avec une meilleure efficacité (Li et al., 2019).

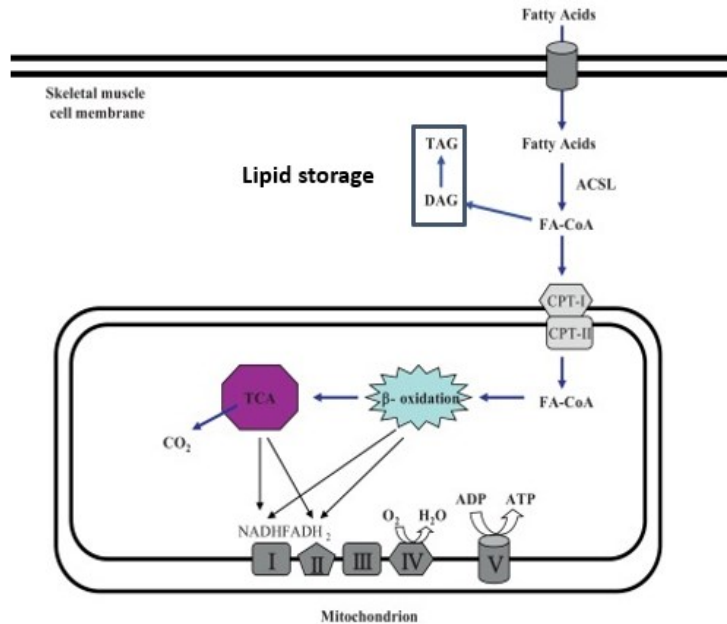


Figure 8: Résumé du métabolisme des acides gras dans le muscle squelettique

Exercise and obesity-induced insulin resistance in skeletal muscle (Kwak, 2013) Copyright©

Creative Commons BY-NC-ND license <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Le MEHP étant un obésogène, il est important de comprendre ses effets aboutissant à l'accumulation des lipides sur les protéines impliquées dans le métabolisme des acides gras à longues chaînes.

➤ **MEHP et protéines impliquées dans l'accumulation des lipides**

L'accumulation de lipides est très probablement due à une augmentation de l'absorption des AG dans le muscle, associée à une diminution de l'oxydation mitochondriale des lipides (Corcoran,

Lamon-Fava, & Fielding, 2007). Les AG en excès sont estérifiés et ensuite stockés (Corcoran et al., 2007). Il est donc possible que dans le muscle squelettique en présence du MEHP, la quantité des ACSL impliquées dans la β -oxydation soit réduite tandis que la quantité des ACSL impliquées dans l'accumulation soient augmentées afin de favoriser l'accumulation des lipides.

Plusieurs études ont montré que le DEHP/MEHP peut entraîner la synthèse des graisses et l'accumulation des lipides (Pradhan, Olsson, & Jass, 2018). Parmi ces études, une étude réalisée sur les cellules hépatiques BRL-3A exposées à des concentrations de MEHP comprises 10 et 200 μ M a montré que le MEHP peut favoriser l'absorption et l'accumulation des lipides dans les hépatocytes en inhibant la voie des JAK2/STAT5 (Zhang et al., 2019). Notons que la voie des JAK2/STAT5 est une voie de signalisation qui joue un rôle important dans le métabolisme des AG au niveau du foie (Zhang et al., 2019).

Une autre étude a été réalisée sur des cellules hépatiques exposées à des concentrations de MEHP comprises entre 50 et 100 μ M qui a mis en évidence une augmentation de l'accumulation des lipides (Xu et al., 2020). Le mécanisme suggéré est que le MEHP inhibe l'activité des protéines impliquées dans la β -oxydation comme les ACSL qui dirigent les acyls-CoA dans la β -oxydation (Xu et al., 2020).

Retenons qu'en dehors des ACSL, il existe d'autres protéines impliquées dans le MAG. Selon la littérature, nous n'avons pas d'information au sujet de l'effet du MEHP sur ces protéines dans le muscle squelettique. Cependant il existe d'autres facteurs qui ont une influence sur ces dernières. Une étude in vivo sur l'efficacité des protéines impliquées dans le transport des AGLC et leur métabolisme a été réalisée au niveau des muscles squelettiques de rat (Nickerson et al.,

2009). Les protéines étudiées étaient le FABPpm, le FAT/CD36 et les FATP1 et 4. Ces protéines ont été surexprimées indépendamment, dans les limites physiologiques normales pour déterminer les effets sur le transport et le métabolisme des AGLC. La surexpression indépendante de chaque transporteur d'AG s'est faite sans altérer l'expression ou le contenu plasmatique des autres transporteurs d'AG (Nickerson et al., 2009). Cette étude a mis en évidence que ces 4 protéines ont chacune augmenté le taux de transport des AG dans le muscle squelettique de rat. Cependant, les FAT/CD36 et FATP4 étaient 2.3 et 1.7 fois plus efficaces que les FABPm et FATP1, respectivement. Chacune de ces protéines de transport a aussi contribué à augmenter l'oxydation des AGLC mais pas leur estérification. La contribution de FABPpm et FAT/CD36 à augmenter l'oxydation des AGLC était 3 fois plus que celle de FATP1 and FATP4 (Nickerson et al., 2009).

Ainsi, *in vivo*, FABPpm, FAT/CD36, FATP1 et FATP4 présentent des spécificités pour le transport des AGLC et contribuent différemment à la régulation du métabolisme des AG sans altérer l'estérification des AGLC en TG (Nickerson et al., 2009). De plus, l'exposition de myocytes squelettiques au MEHP entraîne une réduction de l'oxydation des AG (Rajkumar et al., communication personnelle en annexe). L'exposition périnatale au DEHP des rats peut entraîner l'accumulation de lipides hépatiques en augmentant l'expression des DGAT1 (An et al., 2021). Tout ceci suggère que le MEHP peut inhiber les protéines impliquées dans la β -oxydation des AG et stimuler les protéines impliquées dans l'accumulation des AG dans le muscle squelettique. Cependant nous n'avons pas connaissance d'études sur les effets du MEHP sur les protéines impliquées dans la β -oxydation des AG et l'accumulation des AG dans le muscle squelettique.

Chapitre 2: Problématique -Hypothèse-Objectives

2.1 Problématique

Étant donné :

-Les effets obésogènes du MEHP via l'altération du MAG.

-Le fait que le muscle squelettique soit l'un des principaux tissus à utiliser les AG comme source d'énergie.

-Le rôle essentiel des ACSL dans la régulation du MAG à longues chaînes en estérifiant ces AGLC en acyl-CoA qui seront par la suite dirigés soit vers la β -oxydation pour produire de l'énergie soit vers l'accumulation des AG.

-L'association positive entre les concentrations élevées d'AA dans le plasma et les concentrations urinaires élevées de MEHP chez des femmes souffrant d'obésité (Rajkumar et al., communication personnelle en annexe).

-La préférence de l'ACSL4 pour l'AA en tant que substrat.

-Le manque d'information de l'effet du MEHP sur les ACSL4 dans le muscle squelettique

Il est nécessaire de poursuivre les recherches pour comprendre le rôle des ACSL4 dans l'utilisation des AG par le myoblaste squelettique en réponse au MEHP.

2.2 Hypothèse

Du fait des effets obésogènes du MEHP, nous faisons l'hypothèse que l'exposition des cellules musculaires squelettiques au MEHP altère le métabolisme des AG en modifiant l'expression des ACSL4 au niveau de leur ARNm et au niveau protéique et par conséquence l'activité d'accumulation des lipides.

2.3 Objectifs

En utilisant des myoblastes (cellules précurseurs des myocytes) de la lignée C2C12 de cellules murines, nos objectifs seront de :

1-Déterminer l'effet du MEHP sur les variations d'expression des ACSL4 au niveau des :

- a. ARNm des ACSL4
- b. Protéines ACSL4

2-Déterminer l'effet du MEHP sur l'accumulation des lipides

Chapitre 3: MÉTHODES

3.1 Culture des cellules

Les myoblastes squelettiques de souris C2C12 (ATCC® CRL-1772) de passage 6 ou 8 ont été incubés à 37 °C dans le milieu nutritif de croissance standard Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) enrichi avec 10% de Sérum Foetal Bovin (FBS ; Gibco), 1% L-glutamine (Life Technologies), 1% d'antibiotiques streptomycine/pénicilline (Life Technologie) jusqu'à atteindre une confluence de 90%.

3.2 Exposition des cellules au MEHP

Les cellules ont été exposées à des concentrations finales de 0, 10, 50, 100 et 300 μM de MEHP dans le milieu nutritif pendant 24h. Nous avons utilisé au moins 3 sets de myoblastes soit 6 boîtes de Petri par set. Le MEHP provient de Accustandard (ALR-138 N) avec une pureté de 98,9% déterminée par HPLC et la masse moléculaire est de 278,348 g/mol. Une solution de 0,1% de DMSO a été faite avec de l'eau doublement distillée (ddH₂O) stérilisée à 37°C. Une solution de MEHP de 900 μM a été préparée avec la solution de 0,1% de DMSO. Les solutions de MEHP avec les concentrations finales ont été préparées en diluant la solution de MEHP de 900 μM avec la solution de 0.1% de DMSO. Ensuite, chacune des solutions a été bien mélangée, ajoutée dans la boîte de Petri appropriée, et incubée à 37°C. Chacune des concentrations de MEHP contient la même quantité de 0,1% DMSO. Les contrôles sont des myoblastes exposés à 0,1% de DMSO (0 μM de MEHP).

3.3-Amplification en chaîne par Polymérase, couplée à une transcription inverse en temps réel quantitative (RT-qPCR)

L'extraction et la purification des ARNm ont été faites à partir des myoblastes exposés au MEHP pendant 24h à l'aide de Trizol (Invitrogen, 15596026) et du kit Direct-zol RNA Miniprep Plus (R2070). Ensuite la concentration et la pureté des ARNm ont été déterminées avec le spectrophotomètre (NanoDrop; ThermoFisher Scientific 2000). Les ARNm ont été transcrits inversement avec le kit iScript Advanced cDNA Synthesis pour RT-qPCR (Bio Rad 1708842). Une amplification en chaîne par polymérase quantitative a été faite en triple dans des plaques transparentes de 96 puits en utilisant le kit SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green (BIO RAD), ~ 1 µg d'ADNc et 500 nM d'amorces d'ACSL. Cette méthode nécessite la normalisation précise des gènes d'ACSL4 par rapport à au moins 2 gènes de références stables, exprimés dans la plupart des tissus et qui ne sont pas affectés par les conditions expérimentales d'exposition au MEHP (Nakao, Okauchi, Hashimoto, Wada, & Oishi, 2017). La littérature n'a pas rapporté de gène de références avec de telles caractéristiques concernant l'exposition au MEHP au niveau du muscle squelettique de souris. Cependant une étude sur la détermination de gènes de référence indépendants des rythmes d'alimentation pour les études circadiennes des tissus métaboliques de la souris a mis évidence au niveau du muscle squelettique de souris que les 2 meilleurs gènes de référence dans ce contexte sont: la β -actine et le Ywhaz (Nakao et al., 2017). L'expression relative des ARNm a été déterminée après normalisation par ces 2 gènes de références. Les amorces utilisées proviennent des articles de Ellis et Gong et se trouvent dans le tableau 3 (Ellis, Bowman, & Wolfgang, 2015; Gong et al., 2016).

Tableau 3: Séquences d’amorces de RT-qPCR

Gènes	Sens (5’-3’)	Antisens (5’-3’)
ACSL4	GCTATGACGCCCTCTTTGT	GAATCGGTGTGTCTGAGGGG
B-ACTINE	CCTTCTTGGGTATGGAATCCTGT	CACTGTGTTGGCATAGAGGTCTTTAC
YWHAZ	GAAAAGTTCTTGATCCCCAATGC	TGTGACTGGTCCACAATTCCTT

3.4 Western Blots

Le kit Active Motif nuclear – protocole “Préparation d’extraction de cellules entières” a été utilisé pour l’extraction des protéines ACSL4 dans les myoblastes C2C12 exposés aux différentes concentrations de MEHP (0, 10, 50, 100, 300 μ M) pour 24h. Les concentrations des protéines ont été mesurées à l’aide du kit PierceTM BCA Protein Assay (Thermoscientific). Le protocole standard a été appliqué sur les gels Bolt 4-12% Bis-Tris-Plus (Invitrogen, ThermoFisher Scientific). La solution de blocage, les anticorps primaires et secondaires ont été préparés dans du 5% de BSA dans 0,1% de PBS-T. La membrane a été incubée dans les anticorps suivants: ACSL4 (1:1000) (FACL4 rabbit polyclonal carboxyterminal end IgG Abcam; ab137525); β -actine mouse monoclonal IgG 1 :1000 (SantaCruz; sc47778). Les anticorps secondaires étaient: goat anti-rabbit IgG-HRP 1:5000 (SantaCruz; sc2004), goat anti-mouse IgG-HRP 1:5000 (SantaCruz; sc2031). Les solutions d’ECL (ClarityTM western ECL blotting substrates) ont été utilisées à un ratio de 1 :1. Le ChemiDocTM Touch Imaging System Bio-Rad a été utilisé pour visualiser les bandes de protéines. Le logiciel Image Lab 6.0.1 a été utilisé pour analyser l’intensité de ces bandes.

3.5 Détermination de l'accumulation des lipides

Les lipides neutres ont été extraits des myoblastes de C2C12 préalablement exposés au MEHP à l'aide du kit d'extraction de lipides sans chloroforme (STA-612 Cell Biolabs, Inc.) en suivant les instructions du fabricant. Après la fin de l'exposition au MEHP, les C2C12 ont été rincés avec du PBS 1X et resuspendus dans 200 μ L de PBS 1X. Ensuite 1000 μ L de méthanol ont été ajoutés. La solution obtenue a été mélangée pendant 10 min à l'aide du vortex. Puis 500 μ L d'éthyl acétate ont été ajoutés et mélangés au vortex pendant 5 min. Cette étape avec l'éthyl acétate a été répétée une seconde fois. 1000 μ L du réactif C ont été ajoutés et mélangés au vortex pendant 5 min. Le mélange a été centrifugé à 1000 g pour 5 min. La partie organique contenant les lipides a été retirée et conservée dans un nouveau tube. 1060 μ L d'éthyl acétate ont été ajoutés à la partie aqueuse restante, mélangés au vortex pendant 5 min; centrifugés et la partie organique contenant les lipides a été retirée et rajoutée au tube précédent. Cette dernière étape avec l'éthyl acétate est répétée une dernière fois avec 840 μ L d'éthyl acétate. Le tube contenant la partie organique a été laissé à 37 degrés C jusqu'à ce que la solution s'évapore complètement. Enfin l'extrait de lipide obtenu a été resuspendu dans du chloroforme.

La quantification des lipides a été faite avec le kit (Quantification Kit, STA-617 Cell Biolabs, Inc.) en suivant les instructions du fabricant et en utilisant le lecteur de microplaque BMG Labtech Polarstar Omega. L'expérience s'est faite dans une plaque de 96 puits sur laquelle 40 μ L de standards de lipides et nos extraits de lipides resuspendus dans du chloroforme dilué avec du méthanol à 1/4 ont été distribués en double. Après avoir bien mélangé le contenu de chaque puit, nous avons incubé la plaque à 55 degrés pour 30 min afin de faire complètement évaporer le solvant organique. Ensuite la plaque a été incubée à 4 degrés pour 3 min. Puis nous avons

ajouté 40 μ L d'isopropanol. Nous avons ajouté 200 μ L de diméthyl sulfoxyde 1X. La plaque a été incubée à la température de la pièce pour 15 min à l'abri de la lumière. Finalement, la plaque a été lue à 490 nm pour l'excitation et 585 nm pour l'émission en utilisant le lecteur fluorescent de microplaque BMG Labtech Polarstar Omega.

3.6 Statistiques

Toutes les données ont été obtenues à partir d'au moins 3 expériences indépendantes ($n \geq 3$). Les résultats présentés sont sous la forme : moyenne \pm SD. Les différences entre les traitements ont été analysées par l'ANOVA one-way en ce qui concerne les résultats des Western blot et des RT-qPCR. Les résultats concernant l'accumulation des lipides ont été analysés par le test de Kruskal-Wallis. Les valeurs de $p < 0.05$ ont été considérées statistiquement significatives.

Chapitre 4: RÉSULTATS

Les différentes concentrations de MEHP utilisées et la durée de l'exposition au MEHP de cette étude proviennent des études *in vitro* d'exposition aigüe au MEHP (Chiang et al., 2016; Ellero-Simatos et al., 2011). Notons que la cytotoxicité des concentrations croissantes de MEHP sur les cellules C2C12 a été étudiée (Rajkumar et al., communication personnelle en annexe). Cette étude a montré qu'il n'y avait pas de différence significative dans le nombre de cellules apoptotiques et nécrotiques avec l'exposition des C2C12 à des concentrations croissantes de MEHP (10, 100, 300 μ M), mesurées par les noyaux condensés et les cellules positives au propidium iodide. De plus, la mort cellulaire est toujours restée inférieure à 5 % de la population cellulaire (Rajkumar et al., communication personnelle en annexe). Bien que le MEHP ne soit pas cytotoxique sur les C2C12, nos résultats montrent que leur exposition au MEHP entraîne des effets au niveau de l'expression des ACSL4 mais pas au niveau de l'activité de l'accumulation des lipides.

4.1 Les effets de l'exposition des myoblastes C2C12 au MEHP sur les ARNm ACSL4

Après avoir vérifié que l'exposition aux différentes concentrations de MEHP n'est pas cytotoxique pour les C2C12, l'effet du MEHP sur les ARNm d'ACSL4 a été déterminé. La pureté des ARN a été déterminée par les rapports A260/A280 et A260/A230 (Tableaux 4 et 5).

Tableau 4: Ratios A260/A280 - Pureté des extraits d'ARN issus des lysats de cellules entières de myoblastes C2C12 exposés à des concentrations de MEHP suivantes (0, 10, 50, 100 et 300 μM) pendant 24h (n=5).

	0 μM	10 μM	50 μM	100 μM	300 μM
Échantillon 1	1.87	1.89	1.9	1.86	1.91
Échantillon 2	1.95	2.01	2.03	2.04	2.03
Échantillon 3	2.09	2.1	2.1	2.17	2.1
Échantillon 4	2.09	2.05	2.06	2.08	2.01
Échantillon 5	2.04	2.02	2.08	2.03	1.99

Tableau 5: Ratios A260/A230 - Pureté des extraits d'ARN issus des lysats de cellules entières de myoblastes C2C12 exposés à des concentrations de MEHP suivantes (0, 10, 50, 100 et 300 μM) pendant 24h (n=5).

	0 μM	10 μM	50 μM	100 μM	300 μM
Échantillon 1	0.99	0.51	0.89	0.92	0.89
Échantillon 2	0.92	1.17	1.15	1.43	0.72
Échantillon 3	2.29	2.32	2.26	2.4	2.27
Échantillon 4	2.14	2.2	2.17	2.25	2.15
Échantillon 5	2.22	2.17	2.24	2.2	2.23

Les acides nucléiques et les protéines ont des maxima d'absorbance à 260 nm et 280 nm respectivement (Wilfinger, Mackey, & Chomczynski, 1997). Le ratio de pureté A260/A280 permet de tester la pureté des acides nucléiques et de s'assurer qu'il n'y a pas de contamination par les protéines. Un ratio de pureté A260/A280 compris entre 1.8 et 2.1 indique un échantillon d'ARN dépourvu de protéines contaminantes. D'autres contaminants comme le phénol, ont une

absorbance à 230 nm. Le ratio de pureté A260/A230 permet de tester la pureté des acides nucléiques par rapport à des contaminations en dehors de celles avec les protéines. Un ratio de pureté A260/A230 supérieur ou égal à 2 indique un échantillon d'ARN dépourvu de la majorité des contaminants non-protéiques.

Selon ces 2 ratios de pureté, la majorité de nos échantillons contient peu de contaminants détectables sauf les échantillons 1 et 2 dont certaines valeurs du ratio A260/A230 sont inférieures à 2. Ceci peut être causé par la présence de résidus de phénol issus de l'extraction des ARN (Wilfinger et al., 1997). Nos 5 échantillons ne contiennent pas de protéines contaminantes détectables.

Nos résultats (voir ci-après) indiquent une tendance à l'augmentation dose-dépendante de la quantité des ARNm d'ACSL4 à mesure que les concentrations de MEHP augmentent tant au niveau des 3 échantillons les plus purs qu'au niveau des 2 échantillons les moins purs. Nous avons donc décidé de considérer tous nos échantillons pour les calculs statistiques.

Concernant les gènes de références, la β -actine et le Ywhaz ont servi à faire la normalisation de l'expression des ARNm d'ACSL4 en raison de leur stabilité en présence du MEHP (Figure 9).

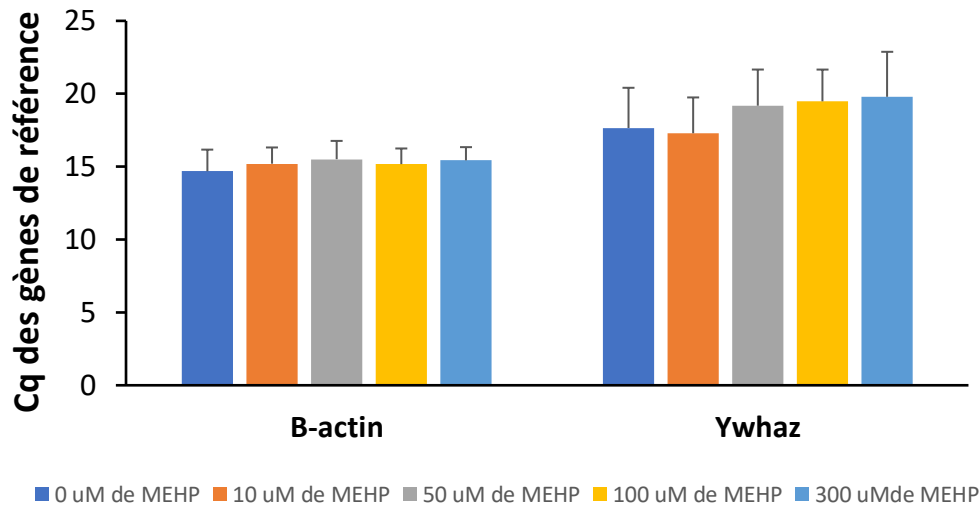


Figure 9: Stabilité des gènes de références β -actine, Ywhaz- Analyse des Cq des 2 gènes de référence issus des lysats de cellules entières de myoblastes C2C12 exposés aux concentrations de MEHP suivantes (0, 10, 50, 100 et 300 μ M) pendant 24h. n=5 expériences indépendantes.

Ces expériences ont révélé que l'exposition des myoblastes de C2C12 aux concentrations croissantes de MEHP entraîne une tendance à l'augmentation de l'expression des ARNm d'ACSL4 ($p=0.365$). On remarque que cette augmentation de l'expression des ARNm d'ACSL4 est dose-dépendante, car l'expression des ARNm d'ACSL4 augmente à mesure que la concentration du MEHP augmente (Figure 10).

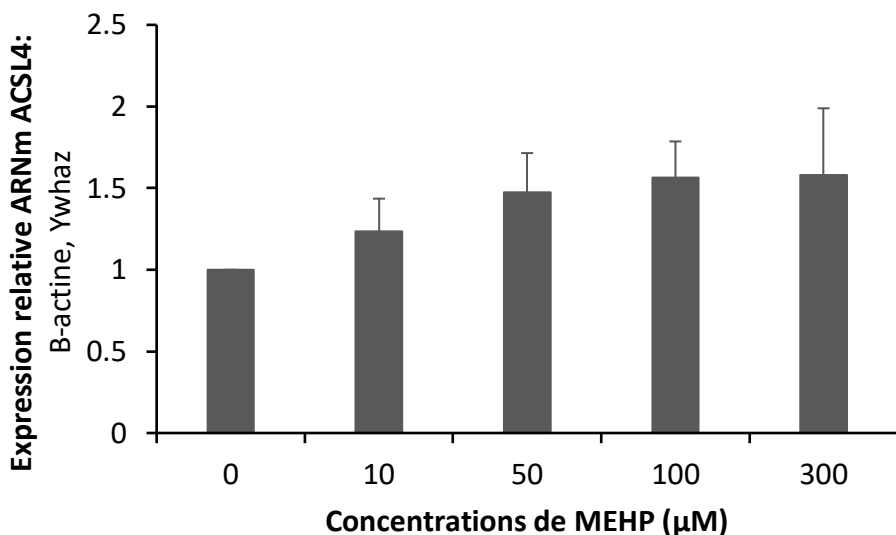


Figure 10: Les effets du MEHP sur les ARNm d'ACSL4 dans les myoblastes C2C12- Analyses des qPCR sur des lysats de cellules entières de myoblastes C2C12 exposés à des concentrations de MEHP suivantes (0, 10, 50, 100 et 300 µM) pendant 24h. n=5 expériences indépendantes. La signification (*) a été fixée à $p < 0,05$.

4.2 Les effets de l'exposition des myoblastes C2C12 au MEHP sur les protéines ACSL4

L'effet du MEHP sur les protéines ACSL5 au niveau des myoblastes C2C12 a été étudié et a montré une diminution des quantités des protéines ACSL5 (Rajkumar et al., communication personnelle en annexe). Il était intéressant pour nous d'étudier l'effet du MEHP sur les protéines ACSL4 sachant que ces protéines ont une sélectivité de substrat pour l'acide arachidonique (AA) dont l'augmentation dans le plasma de femmes souffrant d'obésité a été associée à des concentrations urinaires élevées de MEHP (Chen et al., 2021; Rajkumar et al., communication personnelle en annexe). L'exposition des myoblastes C2C12 aux concentrations croissantes de MEHP entraîne une tendance à la réduction de l'expression des protéines ACSL4 ($p=0.873$)

(Figure 11). Ces résultats en plus de la tendance à l'augmentation dose-dépendante de l'expression des ARNm d'ACSL4 révèlent un possible phénomène de compensation des ACSL4 dans les myoblastes exposés au MEHP dans le but de produire de nouvelles protéines ACSL4 en réponse à la réduction de ces protéines. Nos résultats révèlent également une corrélation inverse entre les niveaux des ARNm d'ACSL4 et ceux des protéines ACSL4 (Figure 12).

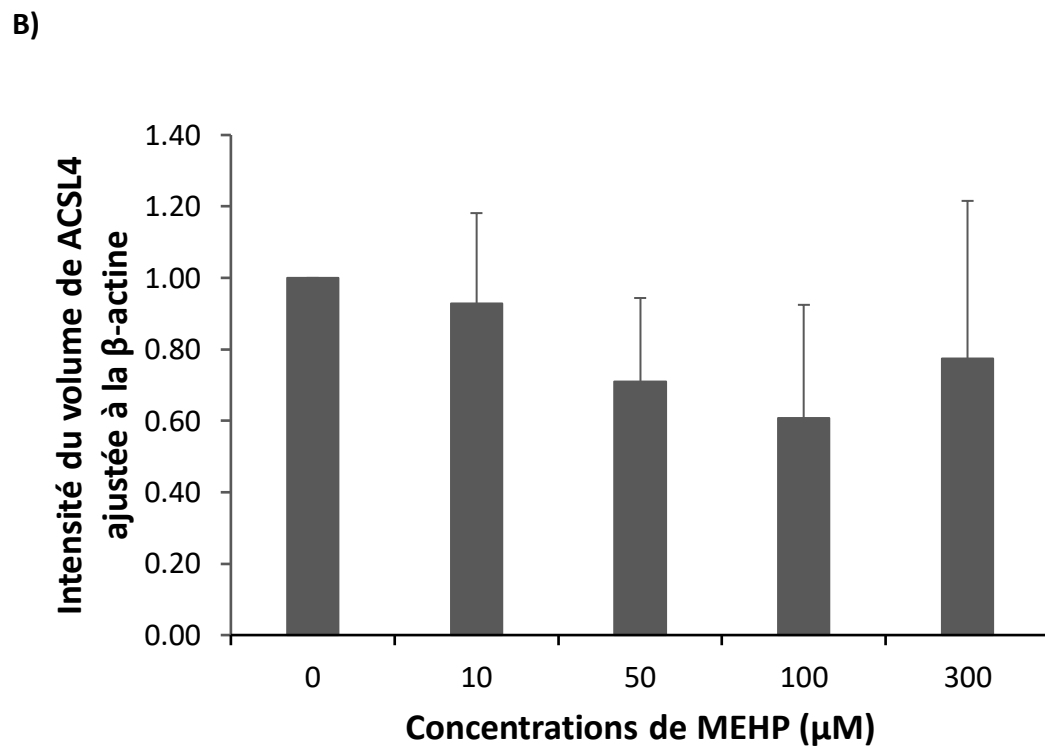
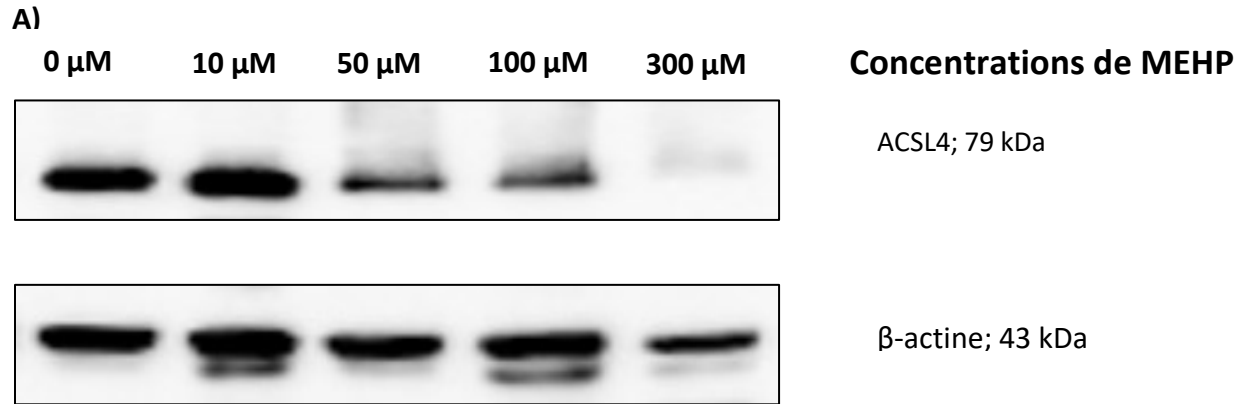


Figure 11 A et B: Les effets du MEHP sur les quantités d'ACSL4 dans les myoblastes C2C12 -

Analyses des WB pour ACSL4 sur des lysats de cellules entières de myoblastes C2C12 exposés à des concentrations de MEHP suivantes (0, 10, 50, 100 et 300 μM) pendant 24h. A- WB

représentatif ; B- Diagramme représentant le niveau moyen (\pm SD) des protéines par rapport au contrôle. n = 4 expériences indépendantes. La signification (*) a été fixée à $p < 0,05$.

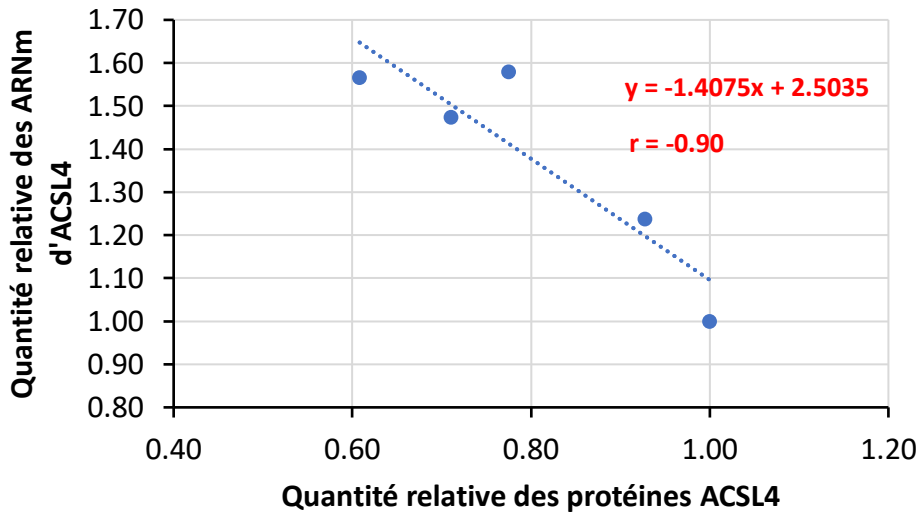


Figure 12: Corrélation entre les quantités relatives d'ARNm et de protéines ACSL4 issus des myoblastes C2C12 - Lysats de cellules entières de myoblastes C2C12 exposés à des concentrations de MEHP suivantes (0, 10, 50, 100 et 300 μ M) pendant 24h (n \geq 4).

4.3 Les effets de l'exposition des myoblastes C2C12 au MEHP sur l'accumulation des lipides

Après avoir déterminé l'effet du MEHP sur l'expression des protéines ACSL4, il était important de déterminer les conséquences au niveau du métabolisme des lipides étant donné que dans le muscle squelettique les ACSL dirigent les acyl-CoA vers la β -oxydation ou l'accumulation des lipides. Sachant que le MEHP est un potentiel obésogène, nous nous sommes intéressées en priorité à la détermination de l'accumulation des lipides. L'exposition des myoblastes C2C12 aux

concentrations croissantes de MEHP comprises entre 10 et 300 μM n'entraîne pas une augmentation de l'accumulation des lipides. Ce résultat ainsi que ces grands écarts-types sont peut-être dus à l'utilisation du chloroforme qui est volatile (Himmel, 2008), et/ou à des problèmes de pipetage. Il serait intéressant qu'une autre technique soit utilisée pour quantifier les lipides. Ces résultats ne permettent pas d'observer une altération du MAG en faveur d'une augmentation de l'accumulation des lipides dans les myoblastes C2C12 exposés au MEHP comme attendu (Figure 13).

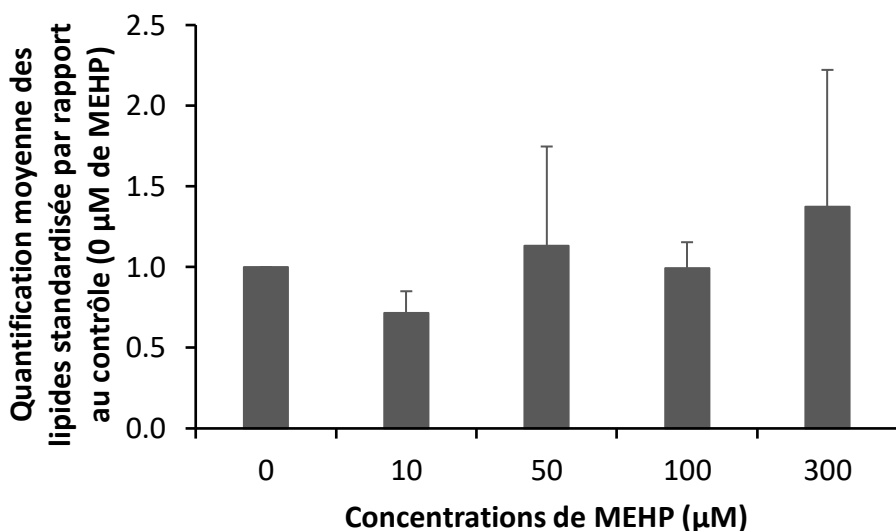


Figure 13: Les effets du MEHP sur les concentrations de lipides dans les myoblastes C2C12-

Mesures des concentrations de lipides neutres sur des lysats de cellules entières de myoblastes C2C12 exposés à des concentrations de MEHP suivantes (0, 10, 50, 100, et 300 μM) pendant 24h. n=3 expériences indépendantes. La signification (*) a été fixée à $p < 0,05$.

Chapitre 5 : DISCUSSION

Le MEHP est la forme métabolique active du DEHP. Le MEHP par ses effets potentiellement obésogènes favoriserait l'accumulation des triglycérides dans les adipocytes différenciés, en altérant le MAG (Ellero-Simatos et al., 2011). Bien que les effets métaboliques du MEHP soient bien connus sur la population générale, il manque des connaissances sur les effets métaboliques du MEHP au niveau cellulaire. Les recherches précédentes sur les effets métaboliques du MEHP ont été faites en majorité sur les adipocytes et les hépatocytes. Le muscle squelettique étant l'un des principaux tissus à utiliser les AG comme source d'énergie, à notre connaissance, aucune recherche à ce sujet n'a été réalisée au niveau du muscle squelettique. Notre étude s'est intéressée aux effets du MEHP sur l'expression des ACSL4 et les conséquences sur le MAG dans les myoblastes C2C12. Nos résultats indiquent une altération du MAG à travers une tendance à l'augmentation de l'expression des ARNm d'ACSL4, une tendance à la diminution des niveaux des protéines ACSL4 dans les myoblastes C2C12 exposés à des concentrations croissantes de MEHP. Cependant, nous n'avons pas observé d'augmentation au niveau de l'accumulation des lipides dans les myoblastes C2C12 exposés à des concentrations croissantes de MEHP.

5.1 Les effets de l'exposition des myoblastes C2C12 au MEHP sur l'expression des ACSL4

Nos résultats montrent une tendance à l'augmentation dose-dépendante de la quantité des ARNm d'ACSL4 à mesure que les concentrations de MEHP augmentent. Pour observer une augmentation significative des quantités des ARNm d'ACSL4, il aurait peut-être fallu avoir plus

d'expériences pour réduire les différences inter-expériences et/ou augmenter la durée d'exposition au MEHP à 48 ou 72h (Chauvigné et al., 2009). L'étude de Chauvigné et al. qui avait pour but d'évaluer l'effet du MEHP sur le développement des testicules de rat a mis en évidence une diminution significative temps-dépendant du nombre de gonocytes 48h et 72 h après le début de l'exposition au MEHP par rapport au contrôle exposé à 0 μ M. Cependant, après 24h, aucun effet significatif n'avait été observé. C'est peut-être le cas de nos expériences. Dans cette logique nous suggérons que le fait d'augmenter le temps d'exposition des C2C12 au MEHP à 48 ou 72h permettrait d'observer des effets significatifs. Sous l'effet du MEHP, les quantités d'ARNm et de protéines ACSL4 sont inversement corrélées avec un coefficient de corrélation $r = -0.90$ (Figure 13). Selon le dogme central de la biologie moléculaire, l'ADN détermine la séquence de l'ARNm produit qui à son tour détermine les séquences des acides aminés de la protéine résultante (Liu, Beyer, & Aebersold, 2016). Dans cette logique, on s'attend généralement à ce que les ARNm et les protéines varient dans le même sens. Cependant, il n'existe aucune relation triviale entre les niveaux d'ARNm et de protéines issus d'un gène spécifique (Liu et al., 2016). En fonction des conditions expérimentales ou du tissu entre autres, les variations d'expression d'une protéine peuvent être ou ne pas être corrélées aux variations de son ARNm codant. La corrélation entre la quantité des protéines et celle des ARNm n'est que partielle, expliquant environ un à deux tiers de la variance des quantités de protéines à l'état stable selon les organismes (Liu et al., 2016; Vogel & Marcotte, 2012). Dans les cellules de mammifères, la fraction restante expliquant la variance des quantités des protéines peut être due à des régulations post-transcriptionnelles, post-traductionnelles et la dégradation des protéines. Dans des conditions environnementales modifiées comme c'est le cas avec l'exposition des myoblastes C2C12 au MEHP, l'adaptation à

court terme des cellules nécessite souvent des mécanismes post-transcriptionnels puisque la régulation par l'ajustement des niveaux de transcription à elle seule serait très lente. Ces mécanismes post-transcriptionnels peuvent entraîner des écarts importants tels qu'une corrélation inverse par rapport à la corrélation attendue entre les variations d'ARNm et celles de leurs protéines (Liu et al., 2016; Vogel & Marcotte, 2012). Ces mécanismes post-transcriptionnels comprennent des mécanismes post-traductionnels comme l'ubiquitination et la dégradation des protéines par les protéasomes (Dengjel et al., 2007; Nakayama & Nakayama, 2006).

Une étude qui s'intéressait à la corrélation entre les niveaux d'ARNm et de protéines ACSL a été réalisée sur des rats (Mashek et al., 2006). Parmi ces rats, un groupe avait une diète à base de céréales, un autre groupe était en état de jeûne pendant 48h et le dernier groupe était en état de jeûne pendant 48h et était ensuite nourri avec une diète à base de 69% de sucrose. Cette étude a montré des changements au niveau des protéines ACSL1 et ACSL4 opposés aux changements au niveau de leur ARNm respectifs suggérant une régulation des ACSL par des mécanismes post-traductionnels (Mashek et al., 2006). Lorsque les rats étaient à jeun pendant 48 heures, les ARNm des ACSL1 et ACSL4 augmentaient dans le foie et le tissu adipeux tandis que les quantités des protéines ACSL1 et ACSL4 diminuaient. Cette dissociation entre l'expression des ARNm et des protéines pour l'ACSL1 et l'ACSL4 peut s'expliquer par le fait que chez les souris qui sont des rongeurs et des mammifères comme les rats, les corrélations entre l'abondance de l'ARNm et des protéines pour un gène donné vont de 0,46 à 0,76 (Hack, 2004). Ceci peut être dû à des différences dans la régulation du traitement et de la traduction des ARNm, ou à des modifications post-traductionnelles affectant le renouvellement des protéines (Mashek et al., 2006).

Étant donné que l'exposition des myoblastes C2C12 à des concentrations croissantes de MEHP entraîne une tendance à la réduction des niveaux des protéines ACSL4 concomitante à une tendance à l'augmentation des niveaux d'ARNm d'ACSL4, il se pourrait que le MEHP favorise l'ubiquitination et la dégradation protéosomique des protéines ACSL4, expliquant la tendance à la réduction des concentrations de ces protéines (Kan et al., 2014; Ramazi & Zahiri, 2021). Nous n'avons pas connaissance du mécanisme sous-jacent. Cependant, la voie de l'ubiquitine (Ub)-protéasome est ubiquitaire et a pour rôle majeur de dégrader les protéines intracellulaires (Lecker, Goldberg, & Mitch, 2006). L'ubiquitine est conjuguée aux protéines destinées à la dégradation par un processus dépendant de l'ATP qui implique trois enzymes (E1, E2 et E3) (Tu et al., 2012). Une chaîne de cinq molécules d'ubiquitine attachées au substrat protéique est suffisante pour que le complexe soit reconnu et dégradé en petits peptides par le protéasome (Tu et al., 2012).

Un phénomène de compensation pourrait expliquer la tendance à l'augmentation des ARNm d'ACSL4 dans le but de remplacer les protéines ACSL4 qui ont été dégradées. Dans cette logique, il semblerait que le MEHP n'ait pas d'effet direct sur les ARNm d'ACSL4 dans les myoblastes C2C12. De plus, des études in vivo et in vitro sur l'exposition des cellules de foie de souris à des quantités excessives d'AG contenant de l'AA ont montré une réduction de la demi-vie des protéines ACSL4 sans affecter la transcription du gène ACSL4 ou la stabilité des ARNm d'ACSL4 (Kan et al., 2014). L'expérience consistait à traiter les cellules hépatiques avec 50 μ M d'AA pendant 8h en présence ou en absence de 20 μ M de MG132 qui est un inhibiteur de protéasome. Des western blots avec des anticorps anti-ACSL4 et anti-ubiquitine ont permis de déterminer l'ubiquitination des ACSL4 endogènes et les niveaux de ces protéines dans les cellules hépatiques

avec ou sans traitement à l'AA. Les résultats suggèrent que des niveaux élevés d'AA régulent les protéines ACSL4 en favorisant leur dégradation via le système ubiquitine-protéasome (Kan et al., 2014). Le MEHP réduirait donc la demi-vie des ACSL4 en stimulant l'ubiquitination et la dégradation protéosomique des protéines ACSL4, expliquant la tendance à la réduction des concentrations de ces protéines.

Il a été montré que le MEHP active les PPAR γ au niveau des C2C12 (Feige et al., 2007); les PPAR α au niveau du foie de rat (Lapinskas et al., 2005); les PPAR α et les PPAR γ au niveau des cellules de la granulosa ovarienne de rat (Lovekamp-Swan, Jetten, & Davis, 2003); les PPAR α au niveau du foie ainsi que les PPAR γ au niveau des adipocytes de souris et d'humains (Hurst & Waxman, 2003). Rappelons que les PPAR α sont majoritaires dans les muscles squelettiques (Wolfrum, 2007). Dans ce cas on peut suggérer que le MEHP active les PPAR α dans les myoblastes C2C12 avec pour conséquence directe une augmentation des ARNm d'ACSL4 suivie d'une augmentation des niveaux des protéines ACSL4. En présence de MEHP, ces protéines seraient dégradées par le système ubiquitine-protéasome (Kan et al., 2014).

5.2 Les effets de l'exposition des myoblastes C2C12 au MEHP sur les protéines ACSL4

Nos résultats montrent une tendance à la réduction de la quantité des protéines ACSL4 à la suite d'une exposition des myoblastes C2C12 au MEHP aux concentrations de 10, 50, 100 et 300 μ M. Les concentrations de DEHP et de MEHP comprises entre 1 et 100 μ M favoriseraient la différenciation des pré-adipocytes murins 3T3-L1 en adipocytes, du fait que le DEHP et le MEHP, pourraient chacun activer le PPAR γ , et augmenter l'adipogenèse (Chiang et al., 2016). Ceci justifie le choix de nos concentrations de MEHP et montre qu'elles sont suffisantes pour entraîner les

effets du MEHP. De plus, l'exposition des myoblastes squelettiques de C2C12 aux concentrations de MEHP comprises entre 10 et 100 μ M montrent bien une tendance à la réduction dose-dépendante de l'expression des protéines ACSL4 à mesure que les concentrations de MEHP augmentent. Pour observer une réduction significative des quantités des protéines ACSL4, il aurait peut-être fallu avoir plus d'expériences pour réduire les différences inter-expériences et/ou augmenter la durée d'exposition au MEHP à 48 ou 72h (Chauvigné et al., 2009).

Les résultats de l'exposition des myoblastes aux concentrations croissantes de MEHP suggèrent que l'exposition au MEHP pourrait altérer le MAG, en réduisant l'expression des protéines ACSL4. Cependant, une étude *in vivo* a été réalisée sur les adipocytes de souris bénéficiant d'un régime alimentaire riche en gras à 60% (Killion et al., 2018). Cette étude a mis en évidence que les souris dépourvus d'ACSL4 spécifiquement dans leurs adipocytes, présentaient une réduction de la masse corporelle de 16%, ainsi qu'une réduction significative de 35% de la masse grasse par rapport aux contrôles avec les protéines ACSL4 dans leurs adipocytes (Killion et al., 2018). Ceci supposerait qu'au niveau des adipocytes, l'augmentation de l'expression des protéines d'ACSL4 favoriserait l'obésité alors que la réduction de l'expression de ces protéines favoriserait la diminution de la masse grasse. Pourtant, l'exposition des myocytes squelettiques C2C12 au MEHP entraîne une diminution de la quantité des protéines ACSL4 et ACSL5 ainsi qu'une réduction de l'oxydation des AG (Rajkumar, et al., communication personnelle en annexe). De plus la réduction de la β -oxydation des AG dans les cellules musculaires, peut favoriser l'accumulation des lipides et entraîner l'obésité (Perdomo et al., 2004). Alors, en tant qu'obésogène (Benjamin et al., 2017; Jacobs et al., 2018), le MEHP peut réduire la β -oxydation des AG dans les C2C12 en réduisant l'expression des protéines ACSL4 comme le montrent nos

résultats. Ceci suggère qu'au niveau des myoblastes squelettiques, le rôle des ACSL4 et ACSL5 seraient d'estérifier les AGLC en acyl-CoA ensuite de les diriger vers la β -oxydation.

En raison de la potentielle altération des capacités des cytochromes P450 à oxyder le MEHP, les personnes souffrants d'obésité sont plus sensibles à l'altération du MAG causée par le MEHP (Yaghjyan et al., 2015). Une analyse secondaire de données issues du National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2004 a montré une association positive entre les niveaux urinaires de MEHP et d'acide arachidonique (AA) plasmatique, chez des femmes souffrant d'obésité (Rajkumar, et al., communication personnelle en annexe). L'AA utilisé dans le tissu musculaire squelettique, par exemple pour produire de l'énergie au cours de la β -oxydation, provient principalement de l'AA plasmatique (Markworth et al., 2018; Zhou, Vessby, & Nilsson, 2002). Ainsi, des niveaux élevés d'AA plasmatiques correspondent à des niveaux élevés d'AA dans le muscle squelettique (Markworth et al., 2018; Zhou et al., 2002). Comme mentionné dans l'introduction, les ACSL4 seraient impliquées dans la conversion de l'AA en arachidonoyl-CoA qui peut ensuite être utilisé dans la β -oxydation (Kang et al., 1997; Soupene & Kuypers, 2008; Xu et al., 2012). Les résultats de cette analyse secondaire de données en plus de ceux de nos expériences supposeraient que l'exposition au MEHP altérerait le métabolisme et l'utilisation de l'AA, en réduisant la quantité des ACSL4 (Rajkumar et al., communication personnelle en annexe).

Il a été démontré qu'une exposition des myotubes squelettiques de C2C12 à des concentrations croissantes de MEHP entraînait une réduction des niveaux d'oxydation des AG et de la respiration mitochondriale (Rajkumar, et al., communication personnelle en annexe). L'oxydation totale de l'acide palmitique a été mesurée dans cette étude. Cette mesure a été faite à partir des produits acides solubles (ASP) extraits des myotubes de C2C12 et du milieu de culture, en plus de la

mesure du CO₂ produit dans le milieu de culture. La respiration mitochondriale a été mesurée dans cette étude par la mesure du taux de consommation de l'oxygène. Dans les myotubes de C2C12 exposés au MEHP, il résulterait une altération de la voie de l'oxydation des AG et de celle de la phosphorylation oxydative, un processus essentiel au métabolisme énergétique (Rajkumar et al., communication personnelle en annexe; Wilson, 2017).

Ces résultats en plus des nôtres, montrent que l'exposition des myoblastes squelettiques au MEHP, pourrait altérer le MAG, en réduisant l'expression des protéines ACSL4.

5.3 Les effets de l'exposition des myoblastes C2C12 au MEHP sur l'accumulation des lipides

L'exposition des C2C12 à des concentrations croissantes de MEHP n'a pas montré une augmentation de la concentration des lipides. Il se pourrait que l'exposition aigüe de 24h des C2C12 au MEHP ne soit pas suffisante pour observer une augmentation de l'accumulation des lipides. Pour observer une augmentation significative des concentrations des lipides, il aurait peut-être fallu avoir plus d'expériences pour réduire les différences inter-expériences et augmenter la durée d'exposition au MEHP à 48 ou 72h (Chauvigné et al., 2009).

Pour les raisons citées ci-dessus, nos résultats n'ont pas pu être en accord avec plusieurs études qui ont montré que le DEHP/MEHP peuvent entraîner la synthèse des graisses et l'accumulation des lipides (Lv et al., 2016; Pradhan et al., 2018).

Cependant, il a été suggéré que l'accumulation de lipides est très probablement due à une augmentation de l'absorption des AG dans le muscle, associée à une diminution de l'oxydation

mitochondriale des lipides (Corcoran et al., 2007). Les AG en excès sont estérifiés et ensuite stockés (Corcoran et al., 2007).

Il a été mis en évidence que l'exposition de cellules hépatiques de rats BRL-3A à des concentrations de MEHP comprises entre 10 et 200 μ M favorise l'absorption des AG et l'accumulation des lipides (Zhang et al., 2019).

Une étude précédente a montré une augmentation de l'accumulation des lipides dans les hépatocytes d'humains exposés à des concentrations de MEHP comprises entre 50 et 100 μ M. Le mécanisme suggéré était que le MEHP inhibe l'activité des ACSL et des protéines impliquées dans la β -oxydation (Xu et al., 2020). L'exposition des myocytes squelettiques C2C12 au MEHP entraîne une tendance à la diminution de la quantité des protéines ACSL4 et une diminution des protéines ACSL5 ainsi qu'une réduction de l'oxydation des AG (Rajkumar et al., communication personnelle en annexe). Nos résultats au niveau de l'exposition des myoblastes C2C12 au MEHP montrent également une réduction de la quantité des protéines ACSL4. Une étude a mis en évidence que la réduction de la β -oxydation des AG dans les cellules musculaires, peut favoriser l'accumulation des lipides et entraîner l'obésité (Perdomo et al., 2004). Ceci laisse suggérer que l'augmentation de l'accumulation des lipides serait favorisée par la réduction de la β -oxydation des AG consécutives à la baisse des concentrations des protéines ACSL4 et ACSL5. En plus un SNP (rs1324805) dans le gène ACSL4 a été associé au syndrome métabolique (Zeman et al., 2009) tandis que le SNP d'ACSL5 rs2419621 a été associé à une meilleure perte de poids en réponse à une diète hypocalorique chez des femmes en surpoids et souffrant d'obésité (Adamo et al., 2007; Rajkumar et al., 2016; Rajkumar et al., 2018; Teng et al., 2009). Le SNP rs58854276 couvrant ACSL5-ZDHHC6 a été associé à la perte de poids fréquente dans la sclérose latérale

amyotrophique (Iacoangeli et al., 2020). Ceci suggère que le rôle des ACSL4 et ACSL5 au niveau du muscle squelettique serait de diriger les acyls-CoA à longues chaînes vers la β -oxydation. L'équilibre du MAG étant altéré par l'exposition des C2C12 au MEHP, favoriserait une augmentation de l'accumulation des lipides. Il est donc possible que le MEHP puisse favoriser une accumulation de lipides dans le muscle squelettique en inhibant la β -oxydation (Chen et al., 2020). Étant donné que le MEHP pourrait activer les PPAR α dans les C2C12, ceci pourrait expliquer le fait que l'exposition des myoblastes C2C12 au MEHP entraîne une augmentation des niveaux des ARNm d'ACSL4 qui aboutit dans un premier temps à une augmentation des quantités des protéines ACSL4. En présence de MEHP, les protéines ACSL4 seraient dégradées par le système ubiquitine-protéasome. La réduction des niveaux des protéines ACSL4 entraînerait une réduction des acyls-CoA produites par ces protéines. Ceci a pour conséquence la réduction de la β -oxydation. Le déséquilibre métabolique ainsi créé serait en faveur d'une augmentation de l'accumulation des lipides.

De plus l'exposition périnatale au DEHP des rats peut entraîner l'accumulation de lipides hépatiques en augmentant l'expression des DGAT1 (An et al., 2021). Rappelons que les DGAT1 sont impliquées dans le couplage du 3ème AG au squelette glycérol pour former les TG au niveau du RE dans le muscle squelettique (Wendel et al., 2009). L'exposition des C2C12 au MEHP pourraient favoriser l'augmentation de l'expression des DGAT1 entraînant ainsi une accumulation de lipides élevée.

L'association positive entre les niveaux urinaires de MEHP et d'AA chez les femmes souffrant d'obésité peut s'expliquer par le fait que l'exposition au MEHP altérerait le MAG et l'utilisation des AA, en réduisant la quantité des ACSL4 (Rajkumar, et al., communication personnelle en

annexe). L'exposition des myoblastes C2C12 à des concentrations croissantes de MEHP altère altèrerait les MAG et l'utilisation des AA en réduisant les niveaux des protéines ACSL4. La réduction de la quantité des protéines ACSL4 sous l'effet du MEHP, pourrait entraîner une augmentation d'AA non convertis en arachidonyl-CoA et une diminution de la β -oxydation avec pour conséquence un MAG en faveur d'une augmentation de l'accumulation des lipides. Cependant nos expériences n'ont pas montré l'effet du MEHP sur l'accumulation des lipides pour les raisons citées précédemment.

Cette recherche interdisciplinaire est la première à notre connaissance à s'intéresser aux effets du MEHP sur l'expression des ACSL4 et l'accumulation des lipides dans le myoblaste squelettique. Il faut noter comme limites de cette étude que les résultats ne sont pas directement extrapolables aux humains car:

- Les expériences ont été réalisées sur des cellules de souris en culture.

- L'exposition des myoblastes au MEHP a été faite pendant 24h, ce qui représente une exposition aiguë différente de la réalité d'une exposition chronique.

- Il existe des différences entre les humains et les souris au niveau des isoformes de certaines ACSL ne permettant pas d'appliquer systématiquement nos résultats aux humains.

CONCLUSION

Nos résultats montrent que l'exposition des myoblastes squelettiques au MEHP, altère l'expression des ACSL4 au niveau des protéines ainsi qu'au niveau des ARNm. Cependant nous n'avons pas pu observer une augmentation de l'accumulation des lipides. Les résultats de notre recherche seraient utiles dans la recherche de solutions à l'obésité liée à l'exposition au MEHP. Les figures 14 et 15 illustrent les mécanismes que nous proposons pour expliquer le rôle des ACSL4 dans la réponse du myoblaste squelettique au MEHP.

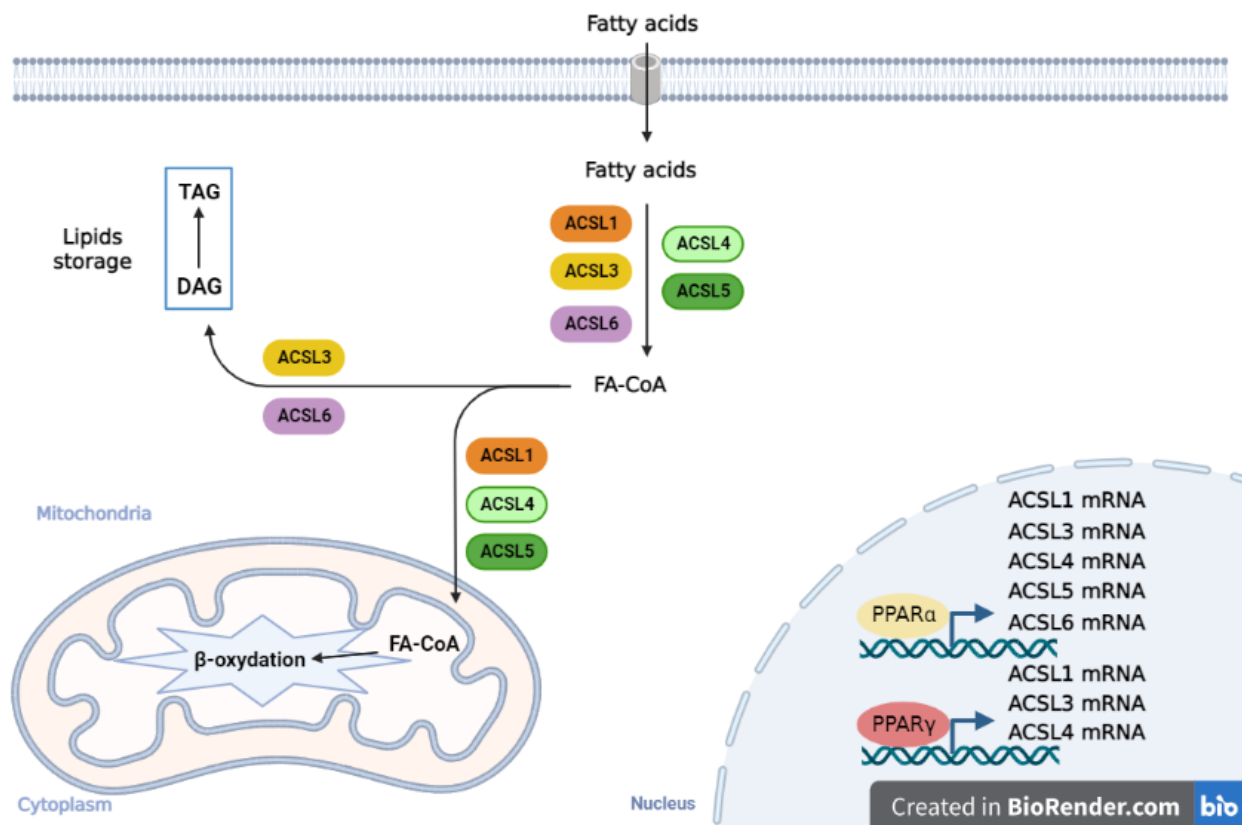


Figure 14: Mécanisme potentiel du rôle des ACSL4 et ACSL5 dans le métabolisme des acides gras (FA) dans les myoblastes C2C12 en conditions physiologiques- Les 5 isoformes d'ACSL contribuent à la conversion des FA en acyl gras-CoA (FA-CoA) qui seront ensuite dirigés vers la β

-oxydation en ce qui concerne les ACSL1, ACSL4 et ACSL5 ou l'accumulation des lipides pour ACSL3 et ACSL6. Le rôle des ACSL4 et ACSL5 serait donc de diriger les FA-CoA qu'elles ont produits vers la β -oxydation. Les PPAR α stimulent les gènes des 5 ACSL tandis que les PPAR γ stimulent les gènes d'ACSL1, ACSL3 et ACSL4.

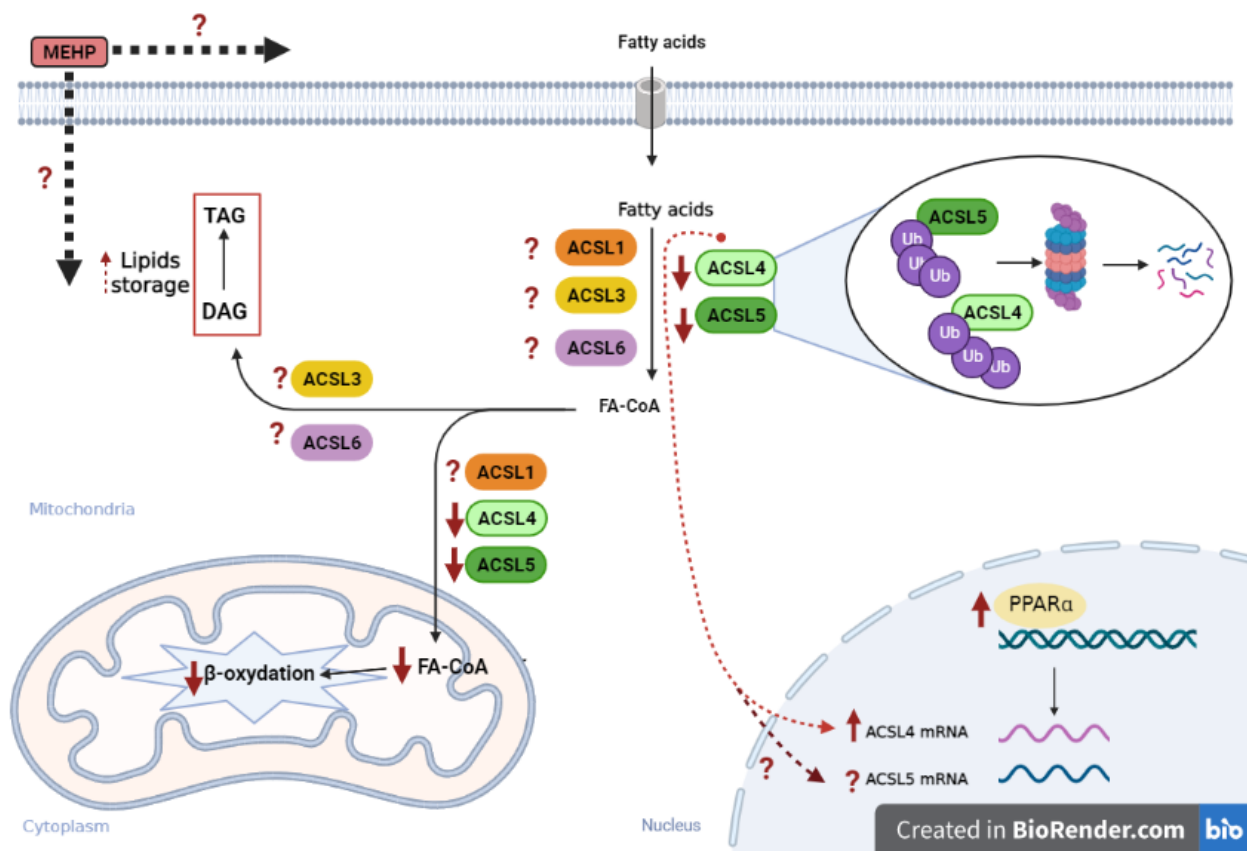


Figure 15: Mécanisme potentiel du rôle des ACSL4 et ACSL5 dans le métabolisme des acides gras (FA) dans les myoblastes C2C12 en présence de MEHP- Nous ne savons pas si le MEHP entre dans les myoblastes C2C12 ou pas. Étant donné que les PPAR α sont majoritaires dans les cellules musculaires, le MEHP pourrait activer les PPAR α dans les myoblastes C2C12 avec pour conséquence directe une augmentation des ARNm d'ACSL4 suivie d'une augmentation des

niveaux des protéines ACSL4. En présence de MEHP, ces protéines seraient dégradées par le système ubiquitine-protéasome. Cette réduction des niveaux des protéines ACSL4 entraînerait une réduction des FA-CoA produites par ces protéines. Ceci aurait pour conséquence la réduction de la β -oxydation. Le déséquilibre métabolique ainsi créé serait en faveur d'une augmentation de l'accumulation des lipides. La réduction des niveaux des protéines ACSL4 pourrait aussi favoriser l'augmentation des ARNm d'ACSL4 dans le but de compenser cette perte. Ceci devrait être le cas pour les ACSL5 mais cela reste à confirmer.

TRAVAUX FUTURS

Cette étude a permis de montrer que l'exposition des myoblastes C2C12 à des concentrations croissantes de MEHP altère le MAG. En raison des effets potentiellement obésogène du MEHP les recherches précédentes sur les effets métaboliques du MEHP ont été réalisées majoritairement sur les adipocytes et les hépatocytes. Cependant aucune recherche de ce genre au niveau du muscle squelettique n'a déjà été réalisée. Notre étude s'est particulièrement intéressée aux effets du MEHP sur l'expression des ACSL4 et les conséquences sur le MAG dans les myoblastes C2C12. Les résultats ont mis en évidence une altération du MAG à travers une tendance à l'augmentation dose-dépendante de l'expression des ARNm d'ACSL4, une tendance à la diminution des niveaux des protéines ACSL4, cependant nous n'avons pas observé d'augmentation de l'accumulation des lipides dans les myoblastes C2C12 exposés au MEHP. Étant donné qu'il a été suggéré que le MEHP réduirait les concentrations de ces protéines ACSL4 en favorisant l'ubiquitination et la dégradation protéosomique de ces protéines ACSL4, il serait

intéressant d'élucider le mécanisme sous-jacent. De plus la relation entre les PPAR et les ACSL4 au niveau de l'accumulation des lipides dans les myoblastes C2C12 exposés au MEHP devrait être examiné plus en profondeur. Nous n'avons pas pu étudier les autres ACSL, nous recommandons donc de répéter cette recherche sur ces dernières avec des cellules musculaires squelettiques humaines avec un temps d'exposition au MEHP plus long. Finalement, une autre technique devrait être utilisée pour quantifier les lipides.

BIBLIOGRAPHIE

- Adamo, K. B., Dent, R., Langefeld, C. D., Cox, M., Williams, K., Carrick, K. M., ... Tesson, F. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 and acyl-CoA synthetase 5 polymorphisms influence diet response. *Obesity*, 15(5), 1068–1075. <https://doi.org/10.1038/oby.2007.630>
- Adeva-Andany, M. M., Carneiro-Freire, N., Seco-Filgueira, M., Fernández-Fernández, C., & Mouriño-Bayolo, D. (2019). Mitochondrial β -oxidation of saturated fatty acids in humans. *Mitochondrion*, 46, 73–90. <https://doi.org/10.1016/J.MITO.2018.02.009>
- An, S. J., Lee, E. J., Jeong, S.-H., Hong, Y.-P., Ahn, S., & Yang, Y.-J. (2021). Perinatal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate induces hepatic lipid accumulation mediated by diacylglycerol acyltransferase 1 Human and Experimental Toxicology. *Human Experimental Toxicology*, 40(10), 1698–1709. <https://doi.org/10.1177/09603271211003314>
- Bagel, S., Dessaigne, B., Bourdeaux, D., Boyer, A., Bouteloup, C., Bazin, J.-E., ... Sautou, V. (2011). Influence of Lipid Type on Bis (2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) Leaching From Infusion Line Sets in Parenteral Nutrition. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 35(6), 770–775. <https://doi.org/10.1177/01486071111414021>
- Barry, Y. A., Labow, R. S., Keon, W. J., Tocchi, M., & Rock, G. (1989). Perioperative exposure to plasticizers in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 97(6), 900–905.
- Benjamin, S., Masai, E., Kamimura, N., Takahashi, K., Anderson, R. C., & Faisal, P. (2017). Phthalates impact human health: Epidemiological evidences and plausible mechanism of action. *Journal of Hazardous Materials*, 340, 360–383. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.06.036>
- Bianco-Miotto, T., Craig, J. M., Gasser, Y. P., Van Dijk, S. J., & Ozanne, S. E. (2017). Epigenetics and DOHaD: from basics to birth and beyond. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 8(5), 513–519. <https://doi.org/10.1017/S2040174417000733>

- Bowman, T. A., O’Keeffe, K. R., D’Aquila, T., Yan, Q. W., Griffin, J. D., Killion, E. A., ... Greenberg, A. S. (2016). Acyl CoA synthetase 5 (ACSL5) ablation in mice increases energy expenditure and insulin sensitivity and delays fat absorption. *Molecular Metabolism*, 5(3), 210–220. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMET.2016.01.001>
- Bu, S. Y., Mashek, M. T., & Mashek, D. G. (2009). Suppression of Long Chain Acyl-CoA Synthetase 3 Decreases Hepatic de Novo Fatty Acid Synthesis through Decreased Transcriptional Activity *. *THE Journal of Biological Chemistry*, 284(44), 30474–30483. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.036665>
- Buser, M. C., Murray, H. E., & Scinicariello, F. (2014). Age and sex differences in childhood and adulthood obesity association with phthalates: Analyses of NHANES 2007-2010. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 217(6), 687–694. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2014.02.005>
- Cadoudal, T., Distel, E., Durant, S., Fouque, F., Blouin, J.-M., Collinet, M., ... Benelli, C. (2008). Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4: Regulation by Thiazolidinediones and Implication in Glyceroneogenesis in Adipose Tissue. *Diabetes*, 57(9), 2272–2279. <https://doi.org/10.2337/db08-0477>
- Cao, X.-L. (2010). Phthalate Esters in Foods: Sources, Occurrence, and Analytical Methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(1), 21–43.
- Cao, Y., Murphy, K. J., Mcintyre, T. M., Zimmerman, G. A., & Prescott, S. M. (2000). Expression of fatty acid-CoA ligase 4 during development and in brain. *FEBS L*, 467(2–3), 263–267.
- Chauvigné, F., Menuet, A., Lesné, L., Chagnon, M. C., Chevrier, C., Regnier, J. F., ... Jégou, B. (2009). Time- and dose-related effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate and its main metabolites on the function of the rat retal testis in vitro. *Environmental Health Perspectives*, 117(4), 515–521. <https://doi.org/10.1289/EHP.11870>
- Chen, J., Ding, C., Chen, Y., Hu, W., Yu, C., Peng, C., ... Zheng, S. (2021). ACSL4 reprograms fatty acid metabolism in hepatocellular carcinoma via c-Myc/SREBP1 pathway. *Cancer Letters*, 502, 154–165. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2020.12.019>
- Chen, Y.-H., Wu, Y.-J., Chen, W.-C., Lee, T.-S., Tsou, T.-C., Chang, H.-C., ... Chen, S.-L. (2020). MEHP interferes with mitochondrial functions and homeostasis in skeletal muscle cells. *Bioscience Reports*, 40(4). <https://doi.org/10.1042/BSR20194404>
- Chiang, H.-C., Kuo, Y.-T., Shen, C.-C., Lin, Y.-H., Wang, S.-L., & Tsou, T.-C. (2016). Mono(2-ethylhexyl)phthalate accumulation disturbs energy metabolism of fat cells. *Archives of Toxicology*, 90(3), 589–601. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1446-9>
- Coleman, R. A., Lewin, T. M., & Muoio, D. M. (2000). Physiological and nutritional regulation of enzymes of triacylglycerol synthesis. *Annual Review of Nutrition*, 20, 77–103. Retrieved from <https://www.proquest.com/docview/204132117?accountid=14701>
- Coleman, R. A., Lewin, T. M., Van Horn, C. G., & Gonzalez-Baró, M. R. (2002). Do Long-Chain Acyl-CoA Synthetases Regulate Fatty Acid Entry into Synthetic Versus Degradative

- Pathways? *Journal of Nutrition*, 132(8), 2123–2126. Retrieved from <https://academic.oup.com/jn/article/132/8/2123/4687719>
- Corbasson, I., Hankinson, S. E., Stanek, E. J., & Reeves, K. W. (2016). Urinary bisphenol-A, phthalate metabolites and body composition in US adults, NHANES 1999–2006. *International Journal of Environmental Health Research*, 26(5–6), 606–617. <https://doi.org/10.1080/09603123.2016.1233524>
- Corcoran, M. P., Lamon-Fava, S., & Fielding, R. A. (2007). Skeletal muscle lipid deposition and insulin resistance: effect of dietary fatty acids and exercise. *Am J Clin Nutr*, 85, 662–677. Retrieved from <https://academic.oup.com/ajcn/article/85/3/662/4632981>
- David, D. K., & Anirban, B. (2016). Estimating the medical care costs of obesity in the united States: Systematics Review, Meta-Analysis, and Empirical Analysis. *Elsevier ScienceDirect Journals*, 19, 602–613.
- De Jong, H., Neal, A. C., Coleman, R. A., & Lewin, T. M. (2007). Ontogeny of mRNA expression and activity of long-chain acyl-CoA synthetase (ACSL) isoforms in *Mus musculus* heart. *Biochim Biophys Acta*, 1771(1), 75–82.
- De Lonlay, P., Djouadi, F., Bonnefont, J. P., Saudubray, J. M., & Bastin, J. (2002). La beta-oxydation mitochondriale des acides gras : une voie métabolique essentielle du fonctionnement musculaire. *Arch Pediatr*.
- Dengjel, J., Akimov, V., Olsen, J. V., Bunkenborg, J., Mann, M., Blagoev, B., & Andersen, J. S. (2007). Quantitative proteomic assessment of very early cellular signaling events. *Nature Biotechnology*, 25(5), 566–568. <https://doi.org/10.1038/nbt1301>
- Digel, M., Eehalt, R., Stremmel, W., & Füllekrug, J. (2009). Acyl-CoA synthetases: Fatty acid uptake and metabolic channeling. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 326(1–2), 23–28. <https://doi.org/10.1007/s11010-008-0003-3>
- Doege, H., & Stahl, A. (2005). Transport of Fatty Acids REVIEWS Protein-Mediated Fatty Acid Uptake: Novel Insights from In Vivo Models. *Physiology*, 21, 259–268. Retrieved from www.physiologyonline.org
- Doherty, G. J., & McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 857–902. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.78.081307.110540>
- Eichmann, T. O., & Lass, A. (2015). DAG tales: the multiple faces of diacylglycerol—stereochemistry, metabolism, and signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2015 72:20, 72(20), 3931–3952. <https://doi.org/10.1007/S00018-015-1982-3>
- Ellero-Simatos, S., Claus, S. P., Benelli, C., Forest, C., Letourneur, F., Cagnard, N., ... de Waziers, I. (2011). Combined Transcriptomic 1 H NMR Metabonomic Study Reveals That Monoethylhexyl Phthalate Stimulates Adipogenesis and Glyceroneogenesis in Human Adipocytes. *Journal of Proteome Research*, 10, 5493–5502. <https://doi.org/10.1021/pr200765v>

- Ellis, J. M., Bowman, C. E., & Wolfgang, M. J. (2015). Metabolic and Tissue-Specific Regulation of Acyl-CoA Metabolism. *PLoS One*, *10*(3), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116587>
- Ellis, J. M., Frahm, J. L., Li, L. O., & Coleman, R. A. (2010). Acyl-coenzyme A synthetases in metabolic control. *Current Opinion in Lipidology*, Vol. 21, pp. 212–217. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e32833884bb>
- Environment Canada Health Canada. (1994). Canadian Environmental Protection Act- Bis-(2-ethylhexyl) phthalate.
- Erythropel, H. C., Maric, M., Nicell, J. A., Leask, R. L., & Yargeau, V. (2014). Leaching of the plasticizer di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) from plastic containers and the question of human exposure. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(24), 9967–9981. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6183-8>
- Farré, D., Roset, R., Huerta, M., Adsua, J. E., Rosello, L., Alba, M. M., & Messeguer, X. (2003). Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Research*, *31*(13), 3651–3653. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg605>
- Feige, J. N., Gelman, L., Rossi, D., Zoete, V., Métivier, R., Tudor, C., ... Desvergne, B. (2007). The Endocrine Disruptor Monoethyl-hexyl-phthalate Is a Selective Peroxisome Proliferator-activated Receptor Modulator That Promotes Adipogenesis *. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(26), 19152–19166. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702724200>
- Feingold, K. R. (2021). Introduction to Lipids and Lipoproteins. *Endotext*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896/>
- Frayn, K. N., Arner, P., & Yki-Järvinen, H. (2006). Fatty acid metabolism in adipose tissue, muscle and liver in health and disease. *Essays in Biochemistry*, *42*, 89–103. <https://doi.org/10.1042/BSE0420089>
- Frederiksen, H., Jorgensen, N., & Andersson, A.-M. (2010). Correlations Between Phthalate Metabolites in Urine, Serum, and Seminal Plasma from Young Danish Men Determined by Isotope Dilution Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometrynced Reader. *Journal of Analytical Toxicology*, *34*, 400–410.
- Fritzen, A. M., Lundsgaard, A.-M., & Kiens, B. (2020). Tuning fatty acid oxidation in skeletal muscle with dietary fat and exercise. *Nature Reviews. Endocrinology*, *16*(12), 683–696. <https://doi.org/10.1038/S41574-020-0405-1>
- Frontera, W. R., & Ochala, J. (2015). Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcif Tissue Int*, *96*, 183–195. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y>
- Fujimoto, Y., Itabe, H., Kinoshita, T., Homma, K. J., Onoduka, J., Mori, M., ... Takano, T. (2007). Involvement of ACSL in local synthesis of neutral lipids in cytoplasmic lipid droplets in human hepatocyte HuH7. *Journal of Lipid Research*, *48*(6), 1280–1292. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700050-JLR200>

- Gimeno, R. E. (2007). Fatty acid transport proteins. *Current Opinion in Lipidology*, 18(3), 271–276. <https://doi.org/10.1097/MOL.0B013E3281338558>
- Gimeno, R. E., Ortegon, A. M., Patel, S., Punreddy, S., Ge, P., Sun, Y., ... Stahl, A. (2003). Characterization of a Heart-specific Fatty Acid Transport Protein*. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(18), 16039–16044. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211412200>
- Glatz, J. F. C., & Luiken, J. J. F. P. (2018). Dynamic role of the transmembrane glycoprotein CD36 (SR-B2) in cellular fatty acid uptake and utilization. *Journal of Lipid Research*, 59, 1084–1093. Retrieved from <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0022227520330698?token=229A6BFC4777424B256F498B7F47F12350A6B7E5EA64B9D6D3E163C2DFEA0E22D9BF0047C333BAABA9AA47A3692D86F8&originRegion=us-east-1&originCreation=20211109142735>
- Glatz, J. F., Jacobs, A. E., & Veerkamp, J. H. (1984). Fatty acid oxidation in human and rat heart. Comparison of cell-free and cellular systems. *Biochim Biophys Acta*, 794(3), 454–465.
- Gong, H., Sun, L., Chen, B., Han, Y., Pang, J., Wu, W., ... Zhang, T.-M. (2016). Evaluation of candidate reference genes for RT-qPCR studies in three metabolism related tissues of mice after caloric restriction. *Scientific Reports*, 6, 38513. <https://doi.org/10.1038/srep38513>
- Gouvernement du Canada. (2021). Évaluation de la mesure de la performance pour la gestion des risques du phtalate de bis(2-éthylhexyle) (DEHP), volet santé. Retrieved November 20, 2021, from Canada.ca website: <https://www.canada.ca/fr/environnement-changement-climatique/services/evaluation-substances-existantes/evaluation-gestion-risques-dehp.html>
- Green, R., Hauser, R., Calafat, A. M., Weuve, J., Schettler, T., Ringer, S., ... Hu, H. (2005). Use of di(2-ethylhexyl) phthalate-containing medical products and urinary levels of mono(2-ethylhexyl) phthalate in neonatal intensive care unit infants. *Environmental Health Perspectives*, 113(9), 1222–1225. <https://doi.org/10.1289/ehp.7932>
- Grün, F., & Blumberg, B. (2006). Environmental Obesogens: Organotins and Endocrine Disruption via Nuclear Receptor Signaling. *Endocrinology*, 147(6), s50–s55. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1129>
- Hack, C. J. (2004). Integrated transcriptome and proteome data: the challenges ahead. *Briefing in Functional Genomics & Proteomics*, 3(3), 212–219.
- Han, R. H., Wang, M., Fang, X., & Han, X. (2013). Simulation of triacylglycerol ion profiles: bioinformatics for interpretation of triacylglycerol biosynthesis. *Journal of Lipid Research*, 54, 1023–1032. Retrieved from <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0022227520422060?token=2EBADE1AEB31D26FAF41E8C6E42FE8AE8F587E5E2558A00827963B91065944922EFA86B347F50EDCAC446D6C5C20DA5D&originRegion=us-east-1&originCreation=20211125164004>
- Hao, C., Cheng, X., Guo, J., Xia, H., & Ma, X. (2013). Perinatal exposure to diethyl-hexyl-phthalate induces obesity in mice. *Front Biosci (Elite Edition)*, 5, 725–733. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23277027>

- Harley, K. G., Berger, K., Rauch, S., Kogut, K., Henn, B. C., Calafat, A. M., ... Holland, N. (2017). Association of prenatal urinary phthalate metabolite concentrations and childhood BMI and obesity. *Pediatric RESEARCH*, *82*(3), 405–415. <https://doi.org/10.1038/pr.2017.112>
- Health Canada. (2021, December 14). Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in Canadians . Retrieved November 7, 2022, from Environmental and Workplace Health website: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/environmental-workplace-health/reports-publications/environmental-contaminants/human-biomonitoring-resources/2-ethylhexyl-phthalate-canadians.html>
- Himmel, H. M. (2008). Mechanisms Involved in Cardiac Sensitization by Volatile Anesthetics: General Applicability to Halogenated Hydrocarbons? *Critical Reviews in Toxicology*, *38*, 773–803. Retrieved from <https://web-s-ebscohost-com.proxy.bib.uottawa.ca/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=0&sid=21b8fec0-5c4c-4eb7-a0f1-019ecc6bf621%40redis>
- Högberg, J., Hanberg, A., Berglund, M., Skerfving, S., Remberger, M., Calafat, A. M., ... Håkansson, H. (2008). Phthalate diesters and their metabolites in human breast milk, blood or serum, and urine as biomarkers of exposure in vulnerable populations. *Environmental Health Perspectives*, *116*(3), 334–339. <https://doi.org/10.1289/EHP.10788>
- Hotamisligil, G. S., & Bernlohr, D. A. (2015). Metabolic functions of FABPs-mechanisms and therapeutic implications. *Nat Rev. Endocrinol*, *11*, 592–605. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.122>
- Hurst, C. H., & Waxman, D. J. (2003). Activation of PPAR and PPAR by Environmental Phthalate Monoesters. *Toxicological Sciences*, *74*(1), 297–308. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg145>
- Iacoangeli, A., Lin, T., Al Khleifat, A., Jones, A. R., Opie-Martin, S., Coleman, J. R. I., ... Al-Chalabi, A. (2020). Genome-wide Meta-analysis Finds the ACSL5-ZDHHC6 Locus Is Associated with ALS and Links Weight Loss to the Disease Genetics. *Cell Reports*, *33*(4). <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2020.108323>
- Jacobs, H. M., Sant, K. E., Basnet, A., Williams, L. M., Moss, J. B., & Timme-Laragy, A. R. (2018). Embryonic exposure to Mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) disrupts pancreatic organogenesis in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, *195*, 498–507. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.094>
- Jain, S. S., Chabowski, A., Snook, L. A., Schwenk, R. W., Glatz, J. F. C., Luiken, J. J. F. P., & Bonen, A. (2009). Additive effects of insulin and muscle contraction on fatty acid transport and fatty acid transporters, FAT/CD36, FABPpm, FATP1, 4 and 6. *FEBS Letters*, *583*(13), 2294–2300. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2009.06.020>
- Jin, Y., McFie, P. J., Banman, S. L., Brandt, C., & Stone, S. J. (2014). Diacylglycerol Acyltransferase-2 (DGAT2) and Monoacylglycerol Acyltransferase-2 (MGAT2) Interact to Promote Triacylglycerol Synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(41), 28237–

28248. Retrieved from

<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0021925820370848?token=521E0113AD2DE85F09DF58FAAD159DA9944EED1AF143B0E1852BDBE1899C3FDF352D4DEAAA684281CF3481880CAE4436&originRegion=us-east-1&originCreation=20211125171143>

- Kan, C. F. K., Singh, A. B., Stafforini, D. M., Azhar, S., & Liu, J. (2014). Arachidonic acid downregulates acyl-CoA synthetase 4 expression by promoting its ubiquitination and proteasomal degradation[S]. *Journal Lipid Research*, *55*, 1657–1667. <https://doi.org/10.1194/jlr.M045971>
- Kang, M.-J., Fujino, T., Sasano, H., Minekura, H., Yabuki, N., Nagura, H., ... Yamamoto, T. T. (1997). A novel arachidonate-preferring acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal, ovary, and testis. *Biochemistry*, *94*(7), 2880–2884. Retrieved from www.pnas.org.
- Kavlock, R., Barr, D., Boekelheide, K., Breslin, W., Breyse, P., Chapin, R., ... Williams, P. (2006). NTP-CERHR Expert Panel Update on the Reproductive and Developmental Toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, *22*(3), 291–399. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17068859>
- Kavlock, R., Boekelheide, K., Chapin, R., Cunningham, M., Faustman, E., Foster, P., ... Zacharewski, T. (2002). NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Reproductive Toxicology*, *16*, 529–653. Retrieved from https://journals-scholarsportal-info.proxy.bib.uottawa.ca/pdf/08906238/v16i0005/529_ncfteoadtodp.xml
- Kelley, D. E., Goodpaster, B., Wing, R. R., & Simoneau, J. A. (1999). Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *The American Journal of Physiology*, *277*(6), E1130–E1141. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.1999.277.6.E1130>
- Kiens, B., & Roepstorff, C. (2003). Utilization of long-chain fatty acids in human skeletal muscle during exercise. *Acta Physiologica Scandinavica*, *178*(4), 391–396. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.2003.01156.x>
- Killion, E. A., Reeves, A. R., El Azzouny, M. A., Yan, Q.-W., Surujon, D., Griffin, J. D., ... Greenberg, A. S. (2018). A role for long-chain acyl-CoA synthetase-4 (ACSL4) in diet-induced phospholipid remodeling and obesity-associated adipocyte dysfunction. *Molecular Metabolism*, *9*, 43–56. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.01.012>
- Kim, J.-H., Lewin, T. M., & Coleman, R. A. (2001). Expression and Characterization of Recombinant Rat Acyl-CoA Synthetases 1, 4, and 5 selective inhibition by triacsin C and thiazolidinediones. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(27), 24667–24673. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010793200>
- Kim KN, Lee MR, Choi YH, Hwang H, Oh SY, Park C, H. Y. (2016). Association between phthalate exposure and lower handgrip strength in an elderly population: a repeated-measures

- study. *Environmental Health*, 15(1), 93.
- Kitzmann, M., Lantier, L., Hébrard, S., Mercier, J., Foretz, M., & Aguer, C. (2011). Abnormal metabolism flexibility in response to high palmitate concentrations in myotubes derived from obese type 2 diabetic patients. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1812(4), 423–430. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.12.007>
- Kladnicka, I., Bludovska, M., Plavinova, I., Muller, L., & Mullerova, D. (2022). Obesogens in Foods. *Biomolecules*, 12(680), 1–18. <https://doi.org/10.3390/biom12050680>
- Koch, H. M., Preuss, R., & Angerer, J. (2006). Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure - an update and latest results1. *International Journal of Andrology*, 29(1), 155–165. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00607.x>
- Kotlyar, M., & Carson, S. W. (1999). Effects of obesity on the cytochrome P450 enzyme system. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 37(1), 8–19.
- Koves, T. R., Li, P., An, J., Akimoto, T., Slentz, D., Ilkayeva, O., ... Muoio, D. M. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator 1 γ -mediated metabolic remodeling of skeletal myocytes mimics exercise training and reverses lipid-induced mitochondrial inefficiency. *Journal of Biological Chemistry*, 280(39), 33588–33598. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507621200>
- Koves, T. R., Ussher, J. R., Noland, R. C., Slentz, D., Mosedale, M., Ilkayeva, O., ... Muoio, D. M. (2008). Mitochondrial Overload and Incomplete Fatty Acid Oxidation Contribute to Skeletal Muscle Insulin Resistance. *Cell Metabolism*, 7(1), 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.013>
- Krebs, H. A. (1970). The History of the Tricarboxylic Acid Cycle. *Perspectives in Biology and Medicine*, 14(1), 24. <https://doi.org/10.1353/pbm.1970.0001>
- Kuerschner, L., Moessinger, C., & Thiele, C. (2008). Imaging of Lipid Biosynthesis: How a Neutral Lipid Enters Lipid Droplets. *Traffic*, 9(3), 338–352. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0854.2007.00689.X>
- Kuwata, H., & Hara, S. (2019). Role of acyl-CoA synthetase ACSL4 in arachidonic acid metabolism. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 144, 106363. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2019.106363>
- Kuwata, H., Yoshimura, M., Sasaki, Y., Yoda, E., Nakatani, Y., Kudo, I., & Hara, S. (2014). Role of long-chain acyl-coenzyme A synthetases in the regulation of arachidonic acid metabolism in interleukin 1 β -stimulated rat fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1841(1), 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2013.09.015>
- Kwak, H.-B. (2013). Exercise and obesity-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Integrative Medicine Research*, 2(4), 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2013.09.004>
- Kwak, H.-B., Woodlief, T., Green, T., Cox, J., Hickner, R., Neuffer, P., & Cortright, R. (2019). Overexpression of Long-Chain Acyl-CoA Synthetase 5 Increases Fatty Acid Oxidation and

- Free Radical Formation While Attenuating Insulin Signaling in Primary Human Skeletal Myotubes. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(7), 1157. <https://doi.org/10.3390/ijerph16071157>
- Lagerstedt, S. A., Hinrichs, D. R., Batt, S. M., Magera, M. J., Rinaldo, P., & McConnell, J. P. (2001). Quantitative Determination of Plasma C8–C26 Total Fatty Acids for the Biochemical Diagnosis of Nutritional and Metabolic Disorders. *Molecular Genetics and Metabolism*, 73(1), 38–45. <https://doi.org/10.1006/mgme.2001.3170>
- Lapinskas, P. J., Brown, S., Leesnitzer, L. M., Blanchard, S., Swanson, C., Cattley, R. C., & Corton, J. C. (2005). Role of PPAR in mediating the effects of phthalates and metabolites in the liver. *Toxicology*, 207(1), 149–163. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.09.008>
- Lecker, S. H., Goldberg, A. L., & Mitch, W. E. (2006). Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 17(7), 1807–1819. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006010083>
- Lewin, T. M., Kim, J.-H., Granger, D. A., Vance, J. E., & Coleman, R. A. (2001). Acyl-CoA Synthetase Isoforms 1, 4, and 5 Are Present in Different Subcellular Membranes in Rat Liver and Can Be Inhibited Independently. *Journal of Biological Chemistry*, 276(27), 24674–24679. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102036200>
- Lewin, T. M., Van Horn, C. G., Krisans, S. K., & Coleman, R. A. (2002). Rat liver acyl-CoA synthetase 4 is a peripheral-membrane protein located in two distinct subcellular organelles, peroxisomes, and mitochondrial-associated membrane. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 404(2), 263–270. Retrieved from www.academicpress.comABB
- Li, L. O., Grevengoed, T. J., Paul, D. S., Ilkayeva, O., Koves, T. R., Pascual, F., ... Coleman, R. A. (2015). Compartmentalized acyl-CoA metabolism in skeletal muscles regulates systemic glucose homeostasis. *Diabetes*, 64, 23–35. <https://doi.org/10.2337/db13-1070>
- Li, X., Li, Z., Zhao, M., Nie, Y., Liu, P., Zhu, Y., & Zhang, X. (2019). Skeletal Muscle Lipid Droplets and the Athlete's Paradox. *Cells*, 8(3), 249. <https://doi.org/10.3390/CELLS8030249>
- Liu, Y., Beyer, A., & Aebersold, R. (2016). On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell*, 165(3), 535–550. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.03.014>
- Lovekamp-Swan, T., Jetten, A. M., & Davis, B. J. (2003). Dual activation of PPARα and PPARγ by mono-(2-ethylhexyl) phthalate in rat ovarian granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 201(1–2), 133–141. Retrieved from www.elsevier.com/locate/mce
- Lv, Z., Cheng, J., Huang, S., Zhang, Y., Wu, S., Qiu, Y., ... Ke, Y. (2016). DEHP induces obesity and hypothyroidism through both central and peripheral pathways in C3H/He mice. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 24(2), 368–378. <https://doi.org/10.1002/oby.21359>
- Lyko, F. (2018). The DNA methyltransferase family: A versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 19, pp. 81–92. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.80>

- Manikkam, M., Tracey, R., Guerrero-Bosagna, C., & Skinner, M. K. (2013). Plastics Derived Endocrine Disruptors (BPA, DEHP and DBP) Induce Epigenetic Transgenerational Inheritance of Obesity, Reproductive Disease and Sperm Epimutations. *PLoS ONE*, *8*(1), 55387. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055387>
- Markworth, J. F., Mitchell, C. J., D'Souza, R. F., Aasen, K. M. M., Durainayagam, B. R., Mitchell, S. M., ... Cameron-Smith, D. (2018). Arachidonic acid supplementation modulates blood and skeletal muscle lipid profile with no effect on basal inflammation in resistance exercise trained men. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, *128*, 74–86. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2017.12.003>
- Mashek, D. G., Li, L. O., & Coleman, R. A. (2006). Rat long-chain acyl-CoA synthetase mRNA, protein, and activity vary in tissue distribution and in response to diet. *Journal of Lipid Research*, *47*. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600150-JLR200>
- McFie, P. J., Banman, S. L., Kary, S., & Stone, S. J. (2011). Murine Diacylglycerol Acyltransferase-2 (DGAT2) Can Catalyze Triacylglycerol Synthesis and Promote Lipid Droplet Formation Independent of Its Localization to the Endoplasmic Reticulum. *The Journal Of Biological Chemistry*, *286*(32), 28235–28246. Retrieved from <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0021925820575406?token=1984F1201AE532F5F14C58E6DA400191DB39C5C9E2415B43FDBD8F9513BF0BA59F17999F745322A0D11B67AD8973C00C&originRegion=us-east-1&originCreation=20211125174202>
- Meek, M., & Chan, P. (1994). Bis(2-ethylhexyl)phthalate: Evaluation of risks to health from environmental exposure in Canada. *Journal of Environmental Science & Health Part C*, *12*(2), 179–194. <https://doi.org/10.1080/10590509409373439>
- Messeguer, X., Escudero, R., Farré, D., Nunez, O., Martinez, J., & Albà, M. M. (2002). PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *BIOINFORMATICS APPLICATIONS NOTE*, *18*(2), 333–334. Retrieved from <http://www.lsi.upc.es/~alggen/recerca/promo/figuraBioinformatics.html>.
- Mogensen, M., Sahlin, K., Fernstrom, M., Glintborg, D., Vind, B. F., Beck-Nielsen, H., & Hojlund, K. (2007). Mitochondrial respiration is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, *56*(6), 1592–1599. <https://doi.org/10.2337/db06-0981>
- Mootha, V. K., Lindgren, C. M., Eriksson, K. F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., ... Groop, L. C. (2003). PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature Genetics*, *34*(3), 267–273. <https://doi.org/10.1038/ng1180>
- Morales, P. E., Bucarey, J. L., & Espinosa, A. (2017). Muscle Lipid Metabolism: Role of Lipid Droplets and Perilipins.: EBSCOhost. *Journal of Diabetes Research*. Retrieved from <https://web-b-ebsohost-com.proxy.bib.uottawa.ca/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=cf0df4d9-7355-4cea-aeeef-001fb5ebb603%40pdc-v-sessmgr03>
- Murphy, S. M., Kiely, M., Jakeman, P. M., Kiely, P. A., & Carson, B. P. (2016). Optimization of an

in vitro bioassay to monitor growth and formation of myotubes in real time. *Bioscience Reports*, 36(3), 1–10. Retrieved from https://journals-scholarsportal-info.proxy.bib.uottawa.ca/pdf/01448463/v36i0003/nfp_ooaibtformirt.xml

Nakamura, M. T., Yudell, B. E., & Loor, J. J. (2014). Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Progress in Lipid Research*, 53(1), 124–144. <https://doi.org/10.1016/J.PLIPRES.2013.12.001>

Nakao, R., Okauchi, H., Hashimoto, C., Wada, N., & Oishi, K. (2017). Determination of reference genes that are independent of feeding rhythms for circadian studies of mouse metabolic tissues. *Molecular Genetics and Metabolism*, 121(2), 190–197. <https://doi.org/10.1016/J.YMGME.2017.04.001>

Nakayama, K. I., & Nakayama, K. (2006). Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nature*, 6(5), 369–381. Retrieved from <https://web-p-ebscohost-com.proxy.bib.uottawa.ca/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=0&sid=f79c0d4b-ae8c-490e-821f-bdff3f376f3e%40redis>

National heart lung and blood institute. (n.d.). Assessing Your Weight and Health Risk. Retrieved March 22, 2021, from Health information for the public website: https://www.nhlbi.nih.gov/health/educational/lose_wt/risk.htm

NCBI. (2022a). *Acsl1 acyl-CoA synthetase long-chain family member 1 [Mus musculus (house mouse)]*. Retrieved June 4, 2022, from NCBI Genes and expression website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/14081#gene-expression>

NCBI. (2022b). *ACSL1 acyl-CoA synthetase long chain family member 1 [Homo sapiens (human)]*. Retrieved June 4, 2022, from NCBI Genes expression website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2180#gene-expression>

NCBI. (2022c). *Acsl3 acyl-CoA synthetase long-chain family member 3 [Mus musculus (house mouse)]*. Retrieved June 4, 2022, from NCBI Genes and expression website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/74205#gene-expression>

NCBI. (2022d). *ACSL3 acyl-CoA synthetase long chain family member 3 [Homo sapiens (human)]*. Retrieved June 4, 2022, from NCBI Gene and expression website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2181#gene-expression>

NCBI. (2022e). *Acsl4 acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 [Mus musculus (house mouse)]*. Retrieved June 4, 2022, from NCBI Genes and expression website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/50790>

NCBI. (2022f). *ACSL4 acyl-CoA synthetase long chain family member 4 [Homo sapiens (human)]*. Retrieved June 4, 2022, from NCBI Genes and expression website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2182>

NCBI. (2022g). *Acsl5 acyl-CoA synthetase long-chain family member 5 [Mus musculus (house mouse)]*. Retrieved June 4, 2022, from NCBI Genes expression website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/433256>

- NCBI. (2022h). ACSL5 acyl-CoA synthetase long chain family member 5 [Homo sapiens (human)]. Retrieved June 2, 2022, from NCBI Gene expression website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/51703#gene-expression>
- NCBI. (2022i). Acsl6 acyl-CoA synthetase long-chain family member 6 [Mus musculus (house mouse)]. Retrieved June 4, 2022, from NCBI Genes and expression website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/216739>
- NCBI. (2022j). ACSL6 acyl-CoA synthetase long chain family member 6 [Homo sapiens (human)]. Retrieved June 4, 2022, from NCBI Genes and expression website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23305>
- Nickerson, J. G., Alkhateeb, H., Benton, C. R., Lally, J., Nickerson, J., Han, Xi.-X., ... Bonen, A. (2009). Greater Transport Efficiencies of the Membrane Fatty Acid Transporters FAT/CD36 and FATP4 Compared with FABPpm and FATP1 and Differential Effects on Fatty Acid Esterification and Oxidation in Rat Skeletal Muscle. *The Journal Of Biological Chemistry*, 284(24), 16522–16530. Retrieved from <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0021925818930802?token=D6AACC6A8800F71EDA667EB9070C87EF7348CF339A7902629A9B6EA985D0454A1FF671C20AB3455531078C98A143AE8&originRegion=us-east-1&originCreation=20211123191849>
- Noland, R. C. (2015). Exercise and Regulation of Lipid Metabolism. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 135, 39–74. <https://doi.org/10.1016/BS.PMBTS.2015.06.017>
- Oikawa, E., Iijima, H., Suzuki, T., Sasano, H., Sato, H., Kamataki, A., ... Yamamoto, T. T. (1998). A Novel Acyl-CoA Synthetase, ACS5, Expressed in Intestinal Epithelial Cells and Proliferating Preadipocytes. *J. Biochem*, 124(3), 679–685. Retrieved from <https://academic.oup.com/jb/article/124/3/679/923332>
- Olzmann, J. A., & Carvalho, P. (2019). Dynamics and functions of lipid droplets. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 20(3), 137. <https://doi.org/10.1038/S41580-018-0085-Z>
- Patel, M. S., & Harris, R. A. (2016). Metabolic Regulation. *Encyclopedia of Cell Biology*, 1, 288–297. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.10034-3>
- Patti, M. E., Butte, A. J., Crunkhorn, S., Cusi, K., Berria, R., Kashyap, S., ... Mandarino, L. J. (2003). Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14), 8466–8471. <https://doi.org/10.1073/pnas.1032913100>
- Pender, C., Trentadue, A. R., Pories, W. J., Dohm, G. L., Houmard, J. A., & Youngren, J. F. (2006). Expression of genes regulating Malonyl-CoA in human skeletal muscle. *Journal of Cellular Biochemistry*, 99(3), 860–867. <https://doi.org/10.1002/JCB.20944>
- Perdomo, G., Commerford, S. R., Richard, A.-M. T., Adams, S. H., Corkey, B. E., O'Doherty, R. M., & Brown, N. F. (2004). Increased β -Oxidation in Muscle Cells Enhances Insulin-stimulated Glucose Metabolism and Protects against Fatty Acid-induced Insulin Resistance Despite Intramyocellular Lipid Accumulation. *Journal of Biological Chemistry*, 279(26), 27177–

27186. <https://doi.org/10.1074/JBC.M403566200>

- Petersen, K. F., Dufour, S., Befroy, D., Garcia, R., & Shulman, G. I. (2004). Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *The New England Journal of Medicine*, *350*(7), 664–671. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa031314>
- Phielix, E., Schrauwen-Hinderling, V. B., Mensink, M., Lenaers, E., Meex, R., Hoeks, J., ... Schrauwen, P. (2008). Lower intrinsic ADP-stimulated mitochondrial respiration underlies in vivo mitochondrial dysfunction in muscle of male type 2 diabetic patients. *Diabetes*, *57*(11), 2943–2949. <https://doi.org/10.2337/db08-0391>
- Pourteymour, S., Lee, S., Langleite, T. M., Eckardt, K., Hjorth, M., Bindesbøll, C., ... Norheim, F. (2015). Perilipin 4 in human skeletal muscle: localization and effect of physical activity. *Physiological Reports*, *3*(8). <https://doi.org/10.14814/PHY2.12481>
- Pradhan, A., Olsson, P. E., & Jass, J. (2018). Di(2-ethylhexyl) phthalate and diethyl phthalate disrupt lipid metabolism, reduce fecundity and shortens lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere*, *190*, 375–382. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2017.09.123>
- Rahmany, S., & Jialal, I. (2021). Biochemistry, Chylomicron. *StatPearls*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545157/>
- Rajkumar, A., Lamothe, G., Bolongo, P., Harper, M.-E., Adamo, K., Doucet, É., ... Tesson, F. (2016). Acyl-CoA synthetase long-chain 5 genotype is associated with body composition changes in response to lifestyle interventions in postmenopausal women with overweight and obesity: a genetic association study on cohorts Montréal-Ottawa New Emerging Team, and. *BMC Medical Genetics*, *17*(56), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12881-016-0320-4>
- Rajkumar, A., Liaghati, A., Chan, J., Lamothe, G., Dent, R., Doucet, É., ... Tesson, F. (2018). ACSL5 genotype influence on fatty acid metabolism: a cellular, tissue, and whole-body study. *Metabolism Journal*, *83*, 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.03.019>
- Rajkumar, A., Ligali-Cissé, B., Simba, S., Ménard, K., Prud'homme, D., Harper, M.-E., Tesson, F. (Communication personnelle). In vitro and in vivo evidence of bioenergetic metabolism alteration by mono-(2-ethylhexyl) phthalate
- Ramazi, S., & Zahiri, J. (2021). Post-translational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. *Database*, *2021*. <https://doi.org/10.1093/database/baab012>
- Rambold, A. S., Cohen, S., & Lippincott-Schwartz, J. (2015). Fatty acid trafficking in starved cells: regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics. *Developmental Cell*, *32*(6), 678–692. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2015.01.029>
- Rasmussen, B. B., & Wolfe, R. R. (1999). REGULATION OF FATTY ACID OXIDATION IN SKELETAL MUSCLE. *Annual Review of Nutrition*, *19*(1), 463–484. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.19.1.463>

- Ren, H., Zhang, H., Hua, Z., Zhu, Z., Tao, J., Xiao, H., ... Wang, H. (2022). ACSL4 Directs Intramuscular Adipogenesis and Fatty Acid Composition in Pigs. *Animals*, 12(119), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ANI12010119>
- Rett, B. S., & Whelan, J. (2011). Increasing dietary linoleic acid does not increase tissue arachidonic acid content in adults consuming Western-type diets: A systematic review. *Nutrition and Metabolism*, Vol. 8. <https://doi.org/10.1016/j.cnsns.2012.03.001>
- Robelin, J. (1990). Différenciation, croissance et développement cellulaire du tissu musculaire. In Paris: INRA (Vol. 3). Retrieved from <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00895909>
- Roider, H. G., Manke, T., O'keeffe, S., Vingron, M., Haas, S. A., & Valencia, A. (2009). PASTAA: identifying transcription factors associated with sets of co-regulated genes. *BIOINFORMATICS*, 25(4), 435–442. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn627>
- Rose, R. J., Priston, M. J., Rigby-Jones, A. E., & Sneyd, J. R. (2012). The effect of temperature on di(2-ethylhexyl) phthalate leaching from PVC infusion sets exposed to lipid emulsions. *Anaesthesia*, 67(5), 514–520. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2044.2011.07006.x>
- Ross, R., Neeland, I. J., Yamashita, S., Shai, I., Seidell, J., Magni, P., ... Després, J. P. (2020). Waist circumference as a vital sign in clinical practice: a Consensus Statement from the IAS and ICCR Working Group on Visceral Obesity. *Nature Reviews Endocrinology*, 16(3), 177–189. <https://doi.org/10.1038/S41574-019-0310-7>
- Rowdhwal, S. S. S., & Chen, J. (2018). Toxic Effects of Di-2-ethylhexyl Phthalate: An Overview. *BioMed Research International*, 2018, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2018/1750368>
- Sanders, F. W. B., & Griffin, J. L. (2016). De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biol. Rev*, 91, 452–468. <https://doi.org/10.1111/brv.12178>
- Santé Canada. (1994). *Loi canadienne sur la protection de l'environnement: Phtalate de bis (2-éthylhexyle)*. Retrieved from https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/migration/hc-sc/ewh-semt/alt_formats/hecs-sesc/pdf/pubs/contaminants/psl1-lsp1/bis_2/bis_2_ethylhexyl_phthalate-fra.pdf
- Santé Canada. (2019). Phtalates. Retrieved April 7, 2019, from Produits chimiques et polluants website: <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/securite-produits-et-substances-chimiques/phtalates.html>
- Schaedlich, K., Gebauer, S., Hunger, L., Beier, L.-S., Koch, H. M., Wabitsch, M., ... Ernst, J. (2018). DEHP deregulates adipokine levels and impairs fatty acid storage in human SGBS-adipocytes. *Scientific Reports*, 8(3447). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21800-4>
- Shang, J., Corriveau, J., Champoux-Jenane, A., Gagnon, J., Moss, E., Dumas, P., ... Chalifour, L. E. (2019). Recovery From a Myocardial Infarction Is Impaired in Male C57bl/6 N Mice Acutely Exposed to the Bisphenols and Phthalates That Escape From Medical Devices Used in Cardiac Surgery. *TOXICOLOGICAL SCIENCES*, 168(1), 78–94. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy276>

- Smerieri, A., Testa, C., Lazzeroni, P., Nuti, F., Grossi, E., Cesari, S., ... Street, M. E. (2015). Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate Metabolites in Urine Show Age-Related Changes and Associations with Adiposity and Parameters of Insulin Sensitivity in Childhood. *Plos One*, *10*(2), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117831>
- Soupene, E., Dinh, N. P., Siliakus, M., & Kuypers, F. A. (2010). Activity of the acyl-CoA synthetase ACSL6 isoforms: role of the fatty acid Gate-domains. *BMC Biochemistry*, *11*, 18. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-11-18>
- Soupene, E., & Kuypers, F. A. (2008). Mammalian Long-Chain Acyl-CoA Synthetases. *Exp Biol Med*, *233*, 507–521. <https://doi.org/10.3181/0710-MR-287>
- Sparks, L. M., Xie, H., Koza, R. A., Mynatt, R., Hulver, M. W., Bray, G. A., & Smith, S. R. (2005). A High-Fat Diet Coordinately Downregulates Genes Required for Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Skeletal Muscle. In *Diabetes* (Vol. 54). Retrieved from <http://diabetes.diabetesjournals.org>.
- Stahlhut, R. W., van Wijngaarden, E., Dye, T. D., Cook, S., & Swan, S. H. (2007). Concentrations of urinary phthalate metabolites are associated with increased waist circumference and insulin resistance in adult U.S. males. *Environmental Health Perspectives*, *115*(6), 876–882. <https://doi.org/10.1289/ehp.9882>
- Stierwalt, H. D., Ehrlicher, S. E., Robinson, M. M., & Newsom, S. A. (2020). Diet and Exercise Training Influence Skeletal Muscle Long-Chain acyl-CoA Synthetases. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *52*(3), 569–576. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000002164>
- Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., ... Rao, A. (2009). Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science*, *324*(5929), 930–935. <https://doi.org/10.1126/science.1170116>
- Tan, Y., Jin, Y., Zhao, P., Wu, J., & Ren, Z. (2021). Lipid droplets contribute myogenic differentiation in C2C12 by promoting the remodeling of the acstin-filament. *Cell Death and Disease*, *12*, 1–13.
- Tassinari, R., Tait, S., Busani, L., Martinelli, A., Narciso, L., Valeri, M., ... Maranghi, F. (2021). Metabolic, reproductive and thyroid effects of bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) orally administered to male and female juvenile rats at dose levels derived from children biomonitoring study. *Toxicology*, *449*, 152653. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2020.152653>
- Teng, A. C. T., Adamo, K., Tesson, F., & Stewart, A. F. R. (2009). Functional characterization of a promoter polymorphism that drives ACSL5 gene expression in skeletal muscle and associates with diet-induced weight loss. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *23*(6), 1705–1709. <https://doi.org/10.1096/fj.08-120998>
- Teodoro, B. G., Sampaio, I. H., Bomfim, L. H. M., Queiroz, A. L., Silveira, L. R., Souza, A. O., ... Alberici, L. C. (2017). Long-chain acyl-CoA synthetase 6 regulates lipid synthesis and mitochondrial oxidative capacity in human and rat skeletal muscle. *The Journal of*








- Physiology*, 595(3), 677–693. <https://doi.org/10.1113/JP272962>
- Thomson, D. M., & Winder, W. W. (2009). AMPK Control of Fat Metabolism in Skeletal Muscle. *Acta Physiol (Oxf)*, 196(1), 147–154. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2009.01973.x>
- Tu, Y., Chen, C., Pan, J., Xu, J., Zhou, Z.-G., & Wang, C.-Y. (2012). The Ubiquitin Proteasome Pathway (UPP) in the regulation of cell cycle control and DNA damage repair and its implication in tumorigenesis. In *Int J Clin Exp Pathol* (Vol. 5). Retrieved from www.ijcep.com/
- US Food and Drug Administration. (2001). Safety assessment of Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) released from PVC medical devices. *Center for Devices and Radiological Health*, 119.
- Van Loon, L. J. C., Koopman, R., Manders, R., Van Der Weegen, W., Van Kranenburg, G. P., & Keizer, H. A. (2004). Intramyocellular lipid content in type 2 diabetes patients compared with overweight sedentary men and highly trained endurance athletes. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 287(3 50-3). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00464.2003>
- Van Der Vusse, G. J. (2009). Albumin as Fatty Acid Transporter. *Drug Metab. Pharmacokinet*, 24(4), 300–307. Retrieved from <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/dmpk>
- Veerkamp, J. H., Van Moerkerk, H. T., Glatz, J. F., & Van Hinsbergh, V. W. (1983). Incomplete palmitate oxidation in cell-free systems of rat and human muscles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 753, 399–410.
- Veiga-Lopez, A., Pu, Y., Gingrich, J., & Padmanabhan, V. (2018). Obesogenic endocrine disrupting chemicals: identifying knowledge gaps. *Trends Endocrinol Metab*, 29(9), 607–625. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.06.003>
- Virmani, A., Pinto, L., Bauermann, O., Zerelli, S., Diedenhofen, A., Binienda, Z. K., ... van der Leij, F. R. (2015). The Carnitine Palmitoyl Transferase (CPT) System and Possible Relevance for Neuropsychiatric and Neurological Conditions. *Molecular Neurobiology*, 52(2), 826–836. <https://doi.org/10.1007/S12035-015-9238-7/FIGURES/3>
- Vogel, C., & Marcotte, E. M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 227–232. <https://doi.org/10.1038/NRG3185>
- Wang, C. W. (2016). Lipid droplets, lipophagy, and beyond. *Biochim Biophys Acta*, 1861(8), 793–805. Retrieved from <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1388198115002322?token=674951E328781D393C160AACFFC0029F4AD476ACE466C79EA190C8A7B9EB1A123CF1EB7049015494707408C03671A306&originRegion=us-east-1&originCreation=20211202170038>
- Wang, L., Manson, J. E., Rautiainen, S., Gaziano, J. Michael, Buring, J. E., Tsai, M. Y., & Sesso, H. D. (2016). A prospective study of erythrocyte polyunsaturated fatty acid, weight gain, and risk of becoming overweight or obese in middle-aged and older women. *European Journal*

- of Nutrition*, 55, 687–697. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-0889-y>
- Wang, Yu, Zhu, H., & Kannan, K. (2019). A Review of Biomonitoring of Phthalate Exposures. *Toxics*, 7(21). <https://doi.org/10.3390/toxics7020021>
- Wang, Yudong, Johan Palmfeldt, X., Gregersen, N., Makhov, A. M., James Conway, X. F., Wang, M., ... Jerry Vockley, X. (2019). Mitochondrial fatty acid oxidation and the electron transport chain comprise a multifunctional mitochondrial protein complex Downloaded from. *J. Biol. Chem*, 294(33), 12380–12391. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008680>
- Wassenaar, P. N. H., & Legler, J. (2017). Systematic review and meta-analysis of early life exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate and obesity related outcomes in rodents. *Chemosphere*, 188, 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.165>
- Wen, Y., Rattan, S., Flaws, J. A., & Irudayaraj, J. (2020). Multi and transgenerational epigenetic effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in liver. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 402. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2020.115123>
- Wendel, A. A., Lewin, T. M., & Coleman, R. A. (2009). Glycerol-3-phosphate acyltransferases: rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1791(6), 501–506. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2008.10.010>
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, 22(3), 474–481. <https://doi.org/10.2144/97223ST01>
- Wilfling, F., Thiam, A. R., Olarte, M. J., Wang, J., Beck, R., Gould, T. J., ... Walther, T. C. (2014). Arf1/COPI machinery acts directly on lipid droplets and enables their connection to the ER for protein targeting. *ELife*, 2014(3). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.01607>
- Wilson, D. F. (2017). The Journal of Physiology Oxidative phosphorylation: regulation and role in cellular and tissue metabolism. *The Physiological Society*, 595(23), 7023–7038. <https://doi.org/10.1113/JP273839>
- Winberg, L. D., & Badr, M. Z. (1995). Mechanism of phthalate-induced inhibition of hepatic mitochondrial beta-oxidation. *Toxicology Letters*, 76(1), 63–69.
- Wolfrum, C. (2007). Cytoplasmic fatty acid binding protein sensing fatty acids for peroxisome proliferator activated receptor activation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 2465 – 2476. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7279-4>
- World Health Organization. (2018). Obesity and overweight. Retrieved October 12, 2018, from Mediacentre website: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Xu, T., Lim, Y. T., Chen, L., Zhao, H., Low, J. H., Xia, Y., ... Fang, M. (2020). A Novel Mechanism of Monoethylhexyl Phthalate in Lipid Accumulation via Inhibiting Fatty Acid Beta-Oxidation on Hepatic Cells. *Environmental Science and Technology*, 54(24), 15925–15934. https://doi.org/10.1021/ACS.EST.0C01073/SUPPL_FILE/ES0C01073_SI_002.XLSX

- Xu, X., Gopalacharyulu, P., Seppänen-Laakso, T., Ruskeepää, A.-L., Aye, C. C., Carson, B. P., ... Teleman, A. A. (2012). Insulin Signaling Regulates Fatty Acid Catabolism at the Level of CoA Activation. *PLoS Genetics*, *8*(1), e1002478. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002478>
- Xu, Y., Cook, T. J., & Knipp, G. T. (2005). Effects of Di-(2-Ethylhexyl)-Phthalate (DEHP) and Its Metabolites on Fatty Acid Homeostasis Regulating Proteins in Rat Placental HRP-1 Trophoblast Cells. *Toxicological Sciences*, *84*, 287–300. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi083>
- Yaghjian, L., Sites, S., Ruan, Y., & Chang, S.-H. (2015). Associations of urinary phthalates with body mass index, waist circumference and serum lipids among females: National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2004. *Int J of Obes*, *39*(6), 994–1000. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.8>
- Zeman, M., Vecka, M., Jáchymová, M., Jiráček, R., Tvrzická, E., Staňková, B., & Žák, A. (2009). FA4 Polymorphism in Metabolic Syndrome and Depression 287 Fatty Acid CoA Ligase-4 Gene Polymorphism Influences Fatty Acid Metabolism in Metabolic Syndrome, but not in Depression. *Tohoku J. Exp. Med*, *217*(4), 287–293.
- Zhang, Y., Wang, S., Zhao, T., Yang, L., Guo, S., Shi, Y., ... Ye, L. (2019). Mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) promoted lipid accumulation via JAK2/STAT5 and aggravated oxidative stress in BRL-3A cells. *Ecotoxicol Environ Saf.*, *184*, 1–8. Retrieved from <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S014765131930942X?token=FE85E2E91673B4AD9081AB6E0F717DE9E7D6D36291793A3975065D672ABD01404EFB8C818A9BCC029214FC CD0B1FFD5A&originRegion=us-east-1&originCreation=20211124175327>
- Zhao, L., Pascual, F., Bacudio, L., Suchanek, A. L., Young, P. A., Li, L. O., ... Carman, G. M. (2019). Defective fatty acid oxidation in mice with muscle-specific acyl-CoA synthetase 1 deficiency increases amino acid use and impairs muscle function. *Journal of Biological Chemistry*, *294*(22), 8819–8833. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006790>
- Zhou, L., Vessby, B., & Nilsson, A. (2002). Quantitative Role of Plasma Free Fatty Acids in the Supply of Arachidonic Acid to Extrahepatic Tissues in Rats. *The Journal of Nutrition*, *132*(9), 2626–2631. <https://doi.org/10.1093/jn/132.9.2626>

ANNEXE A : Manuscrit à publier

Tous les auteurs du manuscrit ci-dessous ont donné leur accord par écrit pour l'insérer dans cette thèse.

 abi rajkumar      

To: Barrakatou Ligali Epse Cisse
Cc: Frédérique Tesson

Sun 11/27/2022 2:43 PM


Attention : courriel externe | external email
Hi Barrakatou!








Hope you are having a lovely weekend and **congrats** on being close to finishing up your M.Sc!

I have no problem with you adding the paper into your thesis. Good luck!

Abi

Sent from my Bell Samsung device over Canada's largest network.



 Suzanne Simba      

To: Barrakatou Ligali Epse Cisse
Cc: Frédérique Tesson

Mon 12/5/2022 12:13 AM

Attention : courriel externe | external email
Hello Barrakatou,

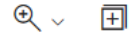
My apologies for the late response. Yes for sure, the article can be included in your thesis.

Thank you

Suzanne Simba

Request for permission to include the MEHP article in my thesis

3 attachments



Barrakatou Ligali Epse Cisse

Hello Katyanna, I hope you are doing well. I am a student candidate for the MSc. in Int...



Fri 11/25/2022 4:20 PM



Katyanna Menard

To: Barrakatou Ligali Epse Cisse

Cc: Frédérique Tesson



Sat 12/3/2022 9:10 AM

Hi,

Yes, of course! Sorry for the late reply!

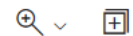
Good luck,
Katyanna

Get [Outlook for iOS](#)



Request for permission to include the MEHP article in my thesis

10 attachments



Some content in this message has been blocked because the sender isn't in your Safe senders list.
[I trust content from denis.prudhomme@umoncton.ca.](#) | [Show blocked content](#)



Denis Prud'homme <denis.prudhomme@umoncton.ca>

To: Barrakatou Ligali Epse Cisse

Cc: Frédérique Tesson



Sun 12/4/2022 6:23 AM


Attention : courriel externe | external email

Bonjour Barrakatou,
Yes no problem. I agree,
Have a nice day,
denisp

Request for permission to include the MEHP article in my thesis

3 attachments



Mary-Ellen Harper 

To: Barrakatou Ligali Epse Cisse

Cc: Frédérique Tesson



Fri 12/2/2022 3:13 PM

Hi Barrakatou

Yes – this would be fine with me. Great to hear that you have made progress on this, and I am very intrigued by your findings!

Sorry for the slow response – it has been a super-busy week.

Best wishes,
Mary-Ellen

***In vitro* and *in vivo* evidence of bioenergetic metabolism alteration by mono-(2-ethylhexyl) phthalate**

Abishankari Rajkumar^{1,2}, Barrakatou Ligali Cissé¹, Suzanne Simba¹, Katyanna Ménard¹, Denis Prud'homme^{3,4,5}, Mary-Ellen Harper², Frédérique Tesson¹

1 Interdisciplinary School of Health Sciences, University of Ottawa, Ottawa, ON, K1N 6N5, Canada

2 Department of Biochemistry, Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Ottawa, Ottawa, ON, K1H 8M5, Canada

3 Institut du Savoir Montfort, Hôpital Montfort, Ottawa, ON, K1K 0T1, Canada

4 School of Human Kinetics, Faculty of Health Sciences, University of Ottawa, Ottawa, ON, K1S 5L5, Canada

5 Present Address: Université de Moncton, Moncton, NB, E1A 3E9, Canada

Emails :

Abishankari Rajkumar, Email :

Barrakatou Ligali Cissé, Email :

Suzanne Simba, Email :

Katyanna Ménard, Email :

Denis Prud'homme, Email: denisprudhomme@montfort.on.ca

Mary-Ellen Harper, Email: mharper@uottawa.ca

* Frédérique Tesson, Email: ftesson@uottawa.ca Phone number : +1 613-562-5800 ext.7370 –
Interdisciplinary School of Health Sciences – Faculty of Health Sciences – University of Ottawa
– 451 Smyth - Ottawa ON K1H 8M5 - Canada (corresponding author)

Funding Information

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research [grant numbers CIHR OTG88590B & FDN143278]

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Abstract

Objective: To better understand the potential alteration of muscle bioenergetic metabolism by the obesogenic toxicant mono-(2ethylhexyl) phthalate (MEHP) the objectives of this research were to determine the: 1) association between urinary MEHP levels and plasma fatty acid levels in women with obesity who participated in National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) studies, and 2) *in vitro* effects of MEHP on fatty acid, or glucose supported mitochondrial energetics and lipids accumulation in C2C12 muscle cells.

Methods: The association between urinary MEHP from NHANES participants with plasma fatty acid levels was studied via secondary data statistical analyses. ¹⁴C-palmitic acid oxidation, Seahorse fatty acid oxidation, glycolysis stress tests, western blot analyses and lipids quantification were conducted on C2C12 cells exposed to increasing MEHP concentrations.

Results: Increased urinary MEHP in women with obesity was associated with increased plasma gamma-linolenic and arachidonic acid levels. C2C12 myotubes exposed to increasing MEHP concentrations, displayed decreased fatty acid oxidation and mitochondrial bioenergetics. Acyl-

CoA synthetase long chain 4 and 5 (ACSL4 and ACSL5) proteins levels were downregulated with increasing MEHP exposure in C2C12 myoblasts while a trend in lipid accumulation was observed. Glycolysis was not significantly modified with increased exposure of C2C12 cells to MEHP.

Conclusion: MEHP exposure may alter fatty acid utilization at the whole-body level in women with obesity and fatty acid utilization in muscle cells. Our findings are consistent with the hypothesis that women with obesity may be particularly susceptible to the effects of MEHP, which alters fatty acid metabolism in muscle cells.

Keywords: MEHP, toxicity, mitochondrial bioenergetics, metabolism, ACSL

1.1 Introduction

Obesogens are defined as chemical compounds that contribute to impaired lipid metabolism, dysregulation of adipogenesis, and consequently, may contribute to the development of obesity (Grün & Blumberg, 2006; Kladnicka et al., 2022). The obesogen, di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), is one of the primary phthalate plasticizers used in North America, and is commonly found in food packaging and medical devices (Health Canada, 2021; Tassinari et al., 2021; US Food and Drug Administration, 2001). DEHP is non-covalently bound into matrices and therefore can leach into the human body and be metabolised via lipases into the monoester derivative mono-(2ethyl hexyl) phthalate (MEHP), one of the major forms to be absorbed (Koch et al., 2006; Rowdhwal & Chen, 2018). While the average tolerable intake for DEHP is 5.8-19 µg/kg/day, individuals exposed to a medical environment can exceed the average daily intake by an increase of ten-fold as observed after cardiopulmonary bypass in adults (Barry et al. 1989; Environment Canada Health Canada 1994; Kavlock et al. 2002).

Previous population studies in women and men, have reported a positive association between urinary phthalate metabolites including MEHP and mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate (MEHHP) and obesity, as well as a positive correlation between DEHP metabolite exposure (measured via urinary metabolites) and BMI, waist circumference and adiposity within children (Buser et al. 2014; Smerieri et al. 2015; Stahlhut et al. 2007). Studies have also illustrated higher urinary MEHP to MEHHP ratio in women with greater BMI, suggesting a slower rate of oxidative metabolism of the toxicant (Yaghjian et al., 2015). A decrease in MEHHP, a product of MEHP oxidation, may be a result of a decrease in activity of selected P450 enzymes, which might affect phthalate metabolism (Kotlyar & Carson, 1999). This may result in the alteration of fatty acid utilization pointing out the importance of studying the effects of MEHP in subjects with obesity.

Studies have shown that increased accumulation of lipids in skeletal muscle of subjects with obesity, may be in part due to a decrease in fatty acid oxidation which contributes towards insulin resistance (Kelley, Goodpaster, Wing, & Simoneau, 1999). Rodent and human studies have illustrated how chronic high fat feeding can lead to elevated incomplete β oxidation, and impairment in mitochondrial oxidative phosphorylation and biogenesis (Koves et al., 2005, 2008; Sparks et al., 2005). Furthermore, rats consuming increased dietary fat and sucrose, had muscle fiber-specific decrease in ATP production (Chanseume et al., 2006; Chanséaume & Morio, 2009). Studies have suggested links between type 2 diabetes/insulin resistance and muscle mitochondrial dysfunction, though this remains controversial (Aguer & Harper, 2012; Mogensen et al., 2007; Mootha et al., 2003; Patti et al., 2003; Petersen, Dufour, Befroy, Garcia, & Shulman, 2004; Phielix et al., 2008).

While little is known about the effects of MEHP on human skeletal muscle, a decrease in muscle strength in the elderly has been shown to be parallel with increasing urinary MEHP, which was

hypothesized to be a result of MEHP-induced oxidative stress and inflammation (Kim et al. 2016). Furthermore, Corbasson et al. (2016) illustrated an association between increased urinary MEHP and decreased lean mass in adults, where lean mass excluded bone mineral content, thus primarily representing muscle mass (Corbasson, Hankinson, Stanek, & Reeves, 2016). While adipocytes have been studied extensively and results have demonstrated altered adipocyte lipid metabolism and mitochondrial respiration, little is known about the cellular and molecular effects of MEHP on skeletal muscle fatty acid and glucose metabolism as well as mitochondrial energetics (Chiang et al., 2016).

Thus, we aimed to determine the 1) association between urinary MEHP and plasma fatty acid levels in women with obesity who participated in the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2004 study, and 2) *in vitro* effects of MEHP on fatty acid or glucose supported mitochondrial energetics in C2C12 muscle cells.

1.2 Material and Methods

1.2.1 NHANES 2003-2004 Study Data Analysis

The NHANES study has been previously described (CDC National Center for Health Statistics., 2017). Briefly, NHANES is an American based survey designed to study the health and nutritional status of both adults and children in United States. NHANES provides extensive data on demographic, dietary and biological laboratory/body measurements. Because the continuous NHANES survey for 2003-2004 was the most recent survey that provided data on plasma fatty acid levels, we selected this population for our secondary statistical analyses. Inclusion criteria were women with obesity ($BMI \geq 30\text{kg/m}^2$) who had data collected for omega-6 fatty acid levels, urinary MEHP levels, age, and ethnicity.

Studied variables have been previously described (CDC National Center of Health Statistics., n.d.). BMI was measured using standard calculations (weight in kg/ height in m²). Urinary MEHP was measured by high performance liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) using isotopically labeled phthalate metabolites as internal standards. Plasma fatty acid levels were measured from 100µl of plasma obtained from individuals who had fasted for ≥ 8 hours.

1.2.2 NHANES 2003-2004 Study Statistical Analyses

Backward stepwise regression analyses were conducted to study the association between urinary MEHP and plasma fatty acid levels. Covariates that were included within the regression models, were continuous variables (age and BMI), and categorical variable (ethnicity: Non-Hispanic White, non-Hispanic Black, Mexican American and other Hispanic). Ethnicity was coded by dummy variables while using non-Hispanic White as the reference level. Urinary MEHP was also included to determine whether it was a significant factor for plasma fatty acid levels. Prior to conducting the statistical analyses, one extreme outlier, based on standard deviation (SD) = 3, was found for urinary MEHP levels and removed from data analysis. Independent variables considered in the regression analyses were also weighted by using sample weight values provided by NHANES. Cohen's f^2 value was calculated, to measure the effect size for each of the independent variables. This value calculates to what extent a specific independent variable contributes to the overall regression model. Descriptive statistics was also conducted to determine the mean, SD, and total participants (n), for all dependent variables studied. All statistical analyses were conducted using Minitab software 17, while a p value <0.05 was considered statistically significant.

1.2.3 Cell Culture

The C2C12 mouse myoblast cell line (ATCC® CRL-1772™) was grown in standard Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM; Gibco) containing 10% Bovine Serum (BS; Gibco), 1% L-glutamine (Life Technologies) and 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies). C2C12 cells were differentiated into myotubes for 7 days in DMEM supplemented with 2% BS.

1.2.4 MEHP Exposure

MEHP (Accu Standard- please see company's precautionary and hazard statements for proper use of chemical) acute exposure design consisted of either C2C12 myoblasts or myotubes exposed to 10, 50, 100, 150, and 300 μM of MEHP (in 0.1% DMSO) for 24 hours. Concentrations of MEHP used were physiologically relevant and previously published by Chiang *et al.* 2016 (Chiang et al., 2016). MEHP solutions were added into culture medium. Cells exposed to 0.1% DMSO and untreated cells served as controls.

1.2.5 MEHP Cytotoxicity Test

C2C12 myotubes were exposed to MEHP (10, 100 and 300 μM of MEHP) for 24 hours with n=3 independent experiments. 1:500 dilution of Propidium Iodide (Sigma; 1mg/ml) and 1:1000 dilution of Hoechst® 33342 (ThermoFisher; 5mg/ml) were added and mixed into culture medium. Following 10 min incubation at 37°C, cells were imaged using the Zeiss Axio Observer D1 Inverted DIC Fluorescence Microscope (20x, 0.80 NA, Air, Plan-Apo (DIC II) Objective; Blue (Ex:390/22 Em:460/50) and Red (Ex:560/40 Em:630/75)).

1.2.6 ¹⁴C-Palmitic acid Oxidation Experiment

Following 24 hour exposure of C2C12 myotubes in a 12-well plate to 10, 100 and 300 μM of MEHP, total palmitic oxidation was assessed using ¹⁴C-palmitic acid, as described previously (Aguer et al., 2013). Briefly, ASP (acid-soluble products) from both culture medium and cells were

extracted (Glatz et al. 1984; Kitzmann et al. 2011; Veerkamp et al. 1983). The remainder of the medium in the glass vials containing benzethonium hydroxide was used for determining CO₂ production. Prior to scintillation counting in a PERKIN ELMER Tri-Carb 2910 TR liquid scintillation counter, all experimental vials were incubated overnight in the dark at room temperature. Three independent experiments were conducted. Total fatty acid oxidation = CO₂ produced + ASP measured from cells and culture medium. All values were adjusted to protein concentration which was determined using the Biorad Protein Assay Dye Reagent.

1.2.7 Mitochondrial Stress Test, and Analyses of Glycolysis and Fatty Acid Oxidation

Following exposure of C2C12 myotubes to 10, 50, 100 and 300 μ M MEHP for 24 hours in 96-well Seahorse plates, mitochondrial stress tests, glycolysis stress tests, and fatty acid oxidation tests were conducted (Agilent's Seahorse protocols). The 50 μ M concentration was only used for mitochondrial stress test and glycolysis stress test. As we were only interested in measuring total fatty acid oxidation, etomoxir addition (which measures endogenous fatty acid oxidation) was omitted from the protocol. Prior to initiating the Seahorse XF assay, 30 μ l of palmitate-BSA (stock concentration: 1 mM) or BSA (stock concentration: 0.17 mM) as control were added into the appropriate wells. Final concentrations for drugs utilized in the fatty acid oxidation and mitochondrial stress test were: oligomycin (3 μ M); Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP; 2 μ M), antimycin (4 μ M), and rotenone (5.6 μ M). Final concentrations for drugs utilized in the glycolysis stress test were oligomycin (3 μ M) and FCCP (2 μ M), glucose (100mM) and 2-deoxy-D-glucose (2-DG; 1M). All experimental results were normalized to results from control untreated cells. Three independent experiments were conducted for the mitochondrial stress test, 5 for the glycolysis stress test and 3 for the fatty acid oxidation test.

1.2.8 Determination of lipid accumulation

Neutral lipids were extracted from C2C12 myoblasts previously exposed to MEHP (10, 50, 100, 300 μM) for 24 hours using the Chloroform-Free Lipid Extraction Kit (STA-612 Cell Biolabs, Inc) following the manufacturer's instructions. The lipid extract obtained was resuspended in chloroform.

Lipid quantification was done with the kit (Quantification Kit, STA-617 Cell Biolabs, Inc.) following the manufacturer's instructions and using the BMG Labtech Polarstar Omega microplate reader. The experiment was performed in a 96-well plate on which 40 μL of lipid standards and our lipid extracts resuspended in chloroform diluted with 1/4 methanol were dispensed in duplicate. After thorough mixing of the contents of each well, the plate was incubated at 55 degrees for 30 min to completely evaporate the organic solvent. Then the plate was incubated at 4 degrees for 3 min and 40 μL of isopropanol and 200 μL of 1X fluorometric reagent were added. The plate was incubated at room temperature for 15 min in the dark. Finally, the plate was read at 490 nm for excitation and 585 nm for emission using the BMG Labtech Polarstar Omega fluorescent microplate reader.

1.2.9 Western Blot Analysis

Active Motif nuclear kit- "Preparation of Whole Cell Extract from Cells" protocol was utilised for the extraction of proteins from C2C12 cells exposed to MEHP (10, 50, 100, 150, 300 μM) for 24 hours, with $n \geq 3$ independent experiments. Protein concentrations were measured using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific).

A standard western blot protocol was implemented using 12% SDS-PAGE gels. All primary and secondary antibodies were prepared in 5% BSA-PBST. Membranes were incubated with the

following primary antibodies: ACSL4/FACL4 rabbit polyclonal carboxyterminal end IgG 1:1000 (Abcam; ab137525), ACSL5 goat polyclonal IgG 1:200 (SantaCruz; sc-47999), β -actin mouse monoclonal IgG 1:1000 (SantaCruz; sc-47778). Secondary antibodies used were goat anti-rabbit IgG-HRP 1:5000 (SantaCruz; sc-2004), rabbit anti-goat IgG-HRP 1:5000 (SantaCruz; sc-2768), and goat anti-mouse IgG-HRP 1:5000 (SantaCruz; sc-2031). Amersham ECL prime western blotting detection reagent or Clarity™ western ECL blotting substrates and VersaDoc MP 4000 system (Biorad) with the Quantity One 4.6.9 Software (Chemi Hi Sensitivity 0.5x Gain Application) or ChemiDoc™ Touch Imaging System Bio-Rad with the Image Lab 6.0.1 Software were used to detect and analyze protein bands. As there was an increased variation in protein band intensity between the different western blot membranes for the C2C12 cells exposed to MEHP, the following western blot quantitative analyses were normalized to results from untreated control cells.

1.2.10 C2C12 in vitro Studies Statistical Analyses

One-way ANOVA statistical analyses with Fisher individual test and independent-samples Kruskal-Wallis test for difference of means was conducted using Minitab 16 and SPSS software respectively.

1.3 Results

1.3.1 MEHP and plasma omega-6 polyunsaturated fatty acid levels in women with obesity participating in the NHANES 2003-2004 Study

Participants' characteristics are presented in Table 1. While the majority of the plasma omega-6 fatty acid levels did not display a significant association with urinary MEHP, a positive association was observed between urinary MEHP levels and gamma-linolenic acid ($0.436 \pm \text{SE: } 0.182$;

p=0.019) as well as arachidonic acid ($7.62 \pm \text{SE: } 1.73$; p=0.000) in women with obesity (Table 2). Furthermore, r^2 adjusted model value explained 35% of the individual variation observed in arachidonic acid levels. Interestingly, it is MEHP which has the largest effect size ($f^2=0.212$) in the linear model explaining variance in plasma arachidonic acid levels. However, while r^2 adjusted model value explained 24% of the individual variation observed in gamma-linolenic acid levels with a major influence of ethnicity, MEHP still influenced the model with an effect size of $f^2=0.056$.

Gamma-linolenic acid is a precursor of arachidonic acid. Increasing adult human dietary gamma-linolenic acid or arachidonic acid induces an increase in tissue and plasma arachidonic acid content (Markworth et al., 2018; Rett & Whelan, 2011). Plasma arachidonic acid is a major source of skeletal tissue arachidonic acid (Zhou et al. 2002). Unmetabolized free arachidonic acid is converted into arachidonoyl-CoA by acyl-coenzyme A synthetases long-chain (ACSL), which play an important role in fatty acid metabolism and are believed to be involved in pathophysiological events (Adamo et al. 2007; Ellis et al. 2010; Rajkumar et al. 2016; Rajkumar et al. 2018; Teng et al. 2009). Based on previous work on rat fibroblasts where these enzymes were shown to play a role in arachidonic acid metabolism, we studied the effects of MEHP on exogenous long-chain fatty acid oxidation, mitochondrial respiration, and glycolysis in C2C12 myotubes (Kuwata et al., 2014).

1.3.2 Evaluation of MEHP cytotoxicity on C2C12 cells

Prior to studying the effects of increasing concentrations of MEHP on C2C12 myotubes, its cytotoxicity was studied. There was no significant difference in the number of apoptotic and necrotic cells with increasing concentrations of MEHP exposure on C2C12 myotubes, measured

by condensed nuclei and PI positive cells (Figure 1). Furthermore, cell death always remained below 5% of the cell population.

1.3.3 The effects of MEHP on exogenous fatty acid oxidation and mitochondrial respiration in C2C12 myotubes

To characterize the metabolic effects of MEHP, ¹⁴C-palmitic acid oxidation as well as palmitate-induced respiration were studied in C2C12 myotubes. There was an overall decrease in total fatty acid oxidation following the exposure of myotubes to increasing concentrations of MEHP (Figure 2 a; p=0.035). Specifically, a decrease was observed between the control 0.1% DMSO (1.183 nmol/hr/mg ± 0.035) and MEHP exposed cells of 10 μM (1.033 nmol/hr/mg ± 0.048; p=0.011), 100 μM MEHP (1.076 nmol/hr/mg ± 0.012; p=0.048) and the highest concentration 300 μM MEHP (1.034 nmol/hr/mg ± 0.022; p=0.012). This reduction in fatty acid oxidation, was accompanied by a reduction in spare respiratory capacity (p=0.012) when studying the muscle cell effects of MEHP on oxygen consumption rate (OCR) (Figure 2 b and c). A decrease in spare respiratory capacity was observed between 0.1% DMSO (1.87 pmol/min/μg ± 0.121), 10 μM (1.85 pmol/min/μg ± 0.177) and the higher concentrations of MEHP, 100 μM (1.10 pmol/min/μg ± 0.279; vs 0.1% DMSO p=0.042; vs 10 μM DMSO p=0.047) and 300 μM (0.65 pmol/min/μg ± 0.281 vs 0.1% DMSO p=0.005; vs 10 μM DMSO p=0.005). While a trend towards a decrease in maximal respiration was observed between 10 μM (1.75 pmol/min/μg ± 0.382) and higher concentrations of 100 μM (0.62 pmol/min/μg ± 0.263) and 300 μM MEHP (0.60 pmol/min/μg ± 0.466), results were not significant. No difference in basal respiration rate was observed between C2C12 myotube exposure to different MEHP concentrations. Furthermore, metabolic effects were only observed during fatty acid-driven oxidation, as mitochondrial stress test demonstrated no difference with exposure to increasing concentrations of MEHP (Supplementary Figure 1).

1.3.4 The effects of MEHP on cellular glycolysis levels

Based on altered fatty acid metabolism in C2C12 myotubes exposed to MEHP, the effects of the toxicant on glucose utilization were studied, since we hypothesized that the latter may act as a compensatory pathway for ATP production. Specifically, the extracellular acidification rate (ECAR) was studied in the Seahorse XF analyzer. ECAR measured during mitochondrial stress test, illustrated a trend towards an increase in basal glycolysis levels following increased exposure to MEHP (Supplementary Figure 1). Furthermore, ECAR measured by the glycolysis stress test in C2C12 myotubes, also illustrated a trending increase in basal glycolysis levels, specifically between 0.1% DMSO control (1.10 ± 0.097) and 300 μ M MEHP (1.40 ± 0.135) (Figure 3).

1.3.5 The effects of MEHP on lipids accumulation

Knowing that MEHP is a potential obesogen, we were interested in determining if MEHP influences lipid accumulation. Exposure of C2C12 myoblasts to increasing concentrations of MEHP between 10 and 300 μ M does not result in increased lipid accumulation ($p=0.763$) (Figure 4). These results do not show an alteration in FAM in favor of an increase in lipid accumulation in C2C12 myoblasts exposed to MEHP as expected.

1.3.6 The effects of MEHP on metabolism related proteins

After examining the effects of MEHP exposure on muscle fatty acid and glucose utilization/metabolism, we studied the toxicant's effect on levels of acyl-CoA synthetase long chain proteins 4 and 5 (ACSL4 and ACSL5), key proteins in long-chain fatty acyl-CoA production from free fatty acids. Increasing the exposure of C2C12 myotubes to MEHP appeared to have no effect on ACSL5 (data not shown) and a trend toward decreased ACSL4 protein levels ($p=0.873$). However, there was a statistically significant decrease in ACSL5 levels ($p=0.032$) with increasing

exposure to MEHP in myoblasts (Figure 5). These results reveal a dose-dependent diminution of ACSL4 and ACSL5 levels in myoblasts exposed to MEHP toxicant.

1.4 Discussion

MEHP, is the monoester hydrolyzed form of the plasticizer DEHP. While much is known about the metabolic effects of MEHP on the general population, how this toxicant influences the metabolism of an individual with obesity remains to be elucidated. Studies have shown that individuals with obesity have elevated intra-myocellular accumulation of lipids in skeletal muscle, in part due to a reduction in fatty acid oxidation thus contributing towards insulin resistance (Kelley et al., 1999; Perdomo et al., 2004). As previous research by Corbasson et al. (2016), has illustrated an inverse association between urinary MEHP and lean mass (which excluded bone mineral content, thus primarily muscle mass), our research was focused on studying the effects of MEHP on muscle cell metabolism. Our results implicate an alteration in fatty acid utilization by MEHP in muscle cells as well as suggest changes in specific fatty acid utilization at the whole-body level in individuals with obesity.

Our secondary data statistical analyses focused on assessing the association between urinary MEHP and plasma fatty acid levels, given that previous studies illustrated that increased DEHP exposure is reflected in urinary levels of the monoester derivative (Green et al., 2005). As we were interested in analysing the effects of MEHP on fatty acid transport and mitochondrial oxidation alteration, we used plasma fatty acid levels as a proxy for mitochondrial bioenergetic function (Lagerstedt et al., 2001). Specifically, previous prospective studies have shown increased omega-6 fatty acids from erythrocytes to be positively associated with weight gain (Wang et al., 2016).

Our results showed a positive association between plasma levels of gamma-linolenic acid and arachidonic acid with urinary MEHP levels. Furthermore, we observed that MEHP has a large effect on plasma arachidonic acid levels. Plasma arachidonic acid is a major source of skeletal tissue arachidonic acid and increases in plasma arachidonic acid and gamma linolenic acid levels are linked with an increase in arachidonic acid in skeletal muscle (Markworth et al. 2018; Zhou et al. 2002). As our secondary statistical analyses included esterified fatty acids that are found in the phospholipids, triglycerides and cholesterol esters, increased levels of gamma-linolenic acid and arachidonic acid that we observed with increased urinary MEHP, may also relate to increase in fatty acids channeled towards lipid biosynthesis. Our findings suggest an alteration of both fatty acid metabolism and utilization of fatty acids at the whole-body level with increased urinary MEHP levels. Due to a potential disruption in their enzymatic activity of MEHP oxidizing cytochrome P450 enzymes, individuals with obesity may be more susceptible to fatty acid metabolic alteration caused by MEHP, as compared to healthy individuals (Yaghjyan et al., 2015). Consequently, this could make them more prone to fatty acids metabolism dysfunction. However, this will need to be confirmed by future studies.

Unmetabolized free arachidonic acid levels are controlled by enzymes such as acyl-coenzyme A synthetases long-chain, which activate fatty acids and play a role in directing fatty acids into different metabolic pathways, and thus are believed to be involved in pathophysiological events (Adamo et al., 2007; Ellis et al., 2010; Kuwata & Hara, 2019; Rajkumar et al., 2016; Rajkumar et al., 2018; Teng et al., 2009). Since our secondary analyses illustrated urinary MEHP's positive association with plasma levels of gamma-linolenic acid and arachidonic acid, we studied the effects of MEHP on muscle cells. Previous work illustrated that MEHP directly activated PPARgamma in C2C12 cells and promoted adipogenesis (Feige et al., 2007). Interestingly, from

our results, exposure of C2C12 myotubes to increased concentrations of MEHP resulted in a disruption in mitochondrial respiration, particularly a decrease in spare respiratory capacity. Spare respiratory capacity, indicates the ability of cells to respond to increases in energy demands. Moreover, we observed a decrease in total fatty acid oxidation and but no increase in lipid accumulation following the exposure to increasing concentrations of MEHP. This lipids accumulation's result is inconsistent with the results of several studies that have shown that exposure to DEHP/MEHP can lead to fat synthesis and lipid accumulation (Lv et al., 2016; Pradhan et al., 2018).

A trend toward decreased ACSL4 proteins and a significant decrease in ACSL5 proteins expression levels was observed within myoblasts exposed to MEHP. To observe a significant reduction in ACSL4 protein amounts, more experiments may have been needed to reduce inter-experimental differences and/or increase the duration of exposure to MEHP to 48 or 72h (Chauvigné et al., 2009). Both ACSL4 and ACSL5, contribute towards the conversion of long-chain free fatty acids to fatty-acyl CoA. ACSL4 has been hypothesized to be involved in cholesterol transport from the endoplasmic reticulum into the mitochondria, intracellular lipid storage, and regulation of arachidonic acid and its metabolites in particular (Kang and al. 1997; Xu and al. 2012; Killion et al. 2018). Moreover, a SNP (rs1324805) in the *ACSL4* gene has been found associated with the metabolic syndrome (Zeman et al., 2009) while the ACSL5 SNP rs2419621 was associated with a better weight loss response following an hypocaloric diet in women with overweight and obesity (Adamo et al., 2007; Rajkumar et al., 2016; Rajkumar et al., 2018; Teng et al., 2009). The decreased in expression of these key proteins within myoblasts may contribute to altered fatty acid metabolism in proliferative cells. The reduction of fatty acid β -oxidation in muscle cells may promote lipid accumulation and lead to obesity (Perdomo et al.,

2004). It has been suggested that exposure of mouse liver cells to high levels of arachidonic acid regulates ACSL4 proteins by promoting their degradation via the ubiquitin-proteasome system (Kan et al., 2014). MEHP would therefore reduce the half-life of ACSL4 and ACSL5 by stimulating ubiquitination and proteosomal degradation of ACSL4 and ACSL5 proteins, explaining the reduction in these proteins' levels. The reduction in ACSL4 and ACSL5 proteins levels would result in a reduction in the acyl-CoA produced by these proteins. This results in the reduction of β -oxidation. The metabolic imbalance thus created would favor an increase in lipid accumulation.

Thus, exposure of C2C12 myotubes to increasing concentrations of MEHP alters fatty acid oxidation and oxidative phosphorylation pathway. Previous research has demonstrated an upregulation of 3T3-L1 adipocyte respiration with increased exposure to MEHP, while exposure of isolated rat liver mitochondria to MEHP showed an inhibition in palmitic acid oxidation as well as a reduction in overall mitochondrial respiration (Chiang et al., 2016; Winberg & Badr, 1995). This illustrates a tissue-specific effect of MEHP on mitochondrial respiration and fatty acid metabolism.

Exposure of C2C12 to increasing concentrations of MEHP did not show an increase in lipid concentration. It may be that the acute 24 h exposure of C2C12 to MEHP is not sufficient to observe an increase in lipid accumulation. To observe a significant increase in lipid concentration, it might be necessary to increase the duration of MEHP exposure to 48 or 72 h (Chauvigné et al., 2009). As it stands, our results do not agree with several studies that have shown that DEHP/MEHP can lead to fat synthesis and lipid accumulation (Lv et al., 2016; Pradhan et al., 2018). Exposure of C2C12 skeletal myocytes to MEHP results in a trend toward decreased ACSL4 protein levels and a decrease in the amount of ACSL5 proteins as well as a reduction in FA oxidation. The

reduction of β -oxidation of FAs in muscle cells, may promote lipid accumulation and lead to obesity (Perdomo et al., 2004).

We observed a trend towards an increase in basal glycolysis between C2C12 control myotubes and myotubes exposed to 300 μ M MEHP. This increase in basal glycolysis is consistent with a compensatory mechanism in the face of impaired mitochondrial energetics.

The present study focuses on the effects of MEHP at both the cellular and whole-body levels in women with obesity. To our knowledge, this is the first study measuring the effects of MEHP on plasma omega-6 polyunsaturated fatty acid (gamma-linolenic acid and arachidonic acid) levels in women with obesity. Future work should examine the metabolic effects of MEHP in men with obesity.

1.5 Conclusion

In conclusion, our current results expand knowledge on the effects of MEHP on cellular and whole-body metabolism. Increased MEHP exposure contributes towards metabolic dysfunction at both the muscle cell and whole-body levels, supporting previous studies on the influence of muscle metabolism on systemic metabolic abnormalities in individuals with insulin resistance and dysregulated glucose metabolism. Altogether our findings are consistent with the conclusion that women with obesity may be more susceptible to the metabolic effects of MEHP.

References

- Adamo, K. B., Dent, R., Langefeld, C. D., Cox, M., Williams, K., Carrick, K. M., ... Tesson, F. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 and acyl-CoA synthetase 5 polymorphisms influence diet response. *Obesity*, *15*(5), 1068–1075.
<https://doi.org/10.1038/oby.2007.630>
- Aguer, C., Fiehn, O., Seifert, E. L., Bézaire, V., Meissen, J. K., Daniels, A., ... Harper, M. E. (2013). Muscle uncoupling protein 3 overexpression mimics endurance training and reduces circulating biomarkers of incomplete β -oxidation. *FASEB Journal*, *27*(10), 4213–4225.
<https://doi.org/10.1096/fj.13-234302>
- Aguer, C., & Harper, M.-E. (2012). Skeletal muscle mitochondrial energetics in obesity and type 2 diabetes mellitus: Endocrine aspects. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, *26*(6), 805–819. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2012.06.001>
- Barry, Y. A., Labow, R. S., Keon, W. J., Tocchi, M., & Rock, G. (1989). Perioperative exposure to plasticizers in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, *97*(6), 900–905.
- Buser, M. C., Murray, H. E., & Scinicariello, F. (2014). Age and sex differences in childhood and adulthood obesity association with phthalates: Analyses of NHANES 2007-2010. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, *217*(6), 687–694.
<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2014.02.005>
- CDC National Center for Health Statistics. (2017). National Health and Nutrition Examination

Survey.

CDC National Center of Health Statistics. (n.d.). NHANES 2003-2004 Lab Methods.

Chanseau, E., Malpuech-Brugere, C., Patrac, V., Bielicki, G., Rousset, P., Couturier, K., ...

Morio, B. (2006). Diets High in Sugar, Fat, and Energy Induce Muscle Type-Specific Adaptations in Mitochondrial Functions in Rats. *Journal of Nutrition*, 136(8), 2194–2200.

Chanséau, E., & Morio, B. (2009). Potential mechanisms of muscle mitochondrial dysfunction in aging and obesity and cellular consequences. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 10, pp. 306–324. <https://doi.org/10.3390/ijms10010306>

Chauvigné, F., Menuet, A., Lesné, L., Chagnon, M. C., Chevrier, C., Regnier, J. F., ... Jégou, B. (2009). Time- and dose-related effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate and its main metabolites on the function of the rat retal testis in vitro. *Environmental Health Perspectives*, 117(4), 515–521. <https://doi.org/10.1289/EHP.11870>

Chen, J., Ding, C., Chen, Y., Hu, W., Yu, C., Peng, C., ... Zheng, S. (2021). ACSL4 reprograms fatty acid metabolism in hepatocellular carcinoma via c-Myc/SREBP1 pathway. *Cancer Letters*, 502, 154–165. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2020.12.019>

Chen, Y.-H., Wu, Y.-J., Chen, W.-C., Lee, T.-S., Tsou, T.-C., Chang, H.-C., ... Chen, S.-L. (2020). MEHP interferes with mitochondrial functions and homeostasis in skeletal muscle cells. *Bioscience Reports*, 40(4). <https://doi.org/10.1042/BSR20194404>

Chiang, H.-C., Kuo, Y.-T., Shen, C.-C., Lin, Y.-H., Wang, S.-L., & Tsou, T.-C. (2016). Mono(2-ethylhexyl)phthalate accumulation disturbs energy metabolism of fat cells. *Archives of Toxicology*, 90(3), 589–601. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1446-9>

- Corbasson, I., Hankinson, S. E., Stanek, E. J., & Reeves, K. W. (2016). Urinary bisphenol-A, phthalate metabolites and body composition in US adults, NHANES 1999–2006. *International Journal of Environmental Health Research*, 26(5–6), 606–617.
<https://doi.org/10.1080/09603123.2016.1233524>
- Corcoran, M. P., Lamon-Fava, S., & Fielding, R. A. (2007). Skeletal muscle lipid deposition and insulin resistance: effect of dietary fatty acids and exercise. *Am J Clin Nutr*, 85, 662–677.
Retrieved from <https://academic.oup.com/ajcn/article/85/3/662/4632981>
- Ellis, J. M., Bowman, C. E., & Wolfgang, M. J. (2015). Metabolic and Tissue-Specific Regulation of Acyl-CoA Metabolism. *PLoS One*, 10(3), 1–22.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116587>
- Ellis, J. M., Frahm, J. L., Li, L. O., & Coleman, R. A. (2010). Acyl-coenzyme A synthetases in metabolic control. *Current Opinion in Lipidology*, Vol. 21, pp. 212–217.
<https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e32833884bb>
- Environment Canada Health Canada. (1994). Canadian Environmental Protection Act- Bis-(2-ethylhexyl) phthalate.
- Feige, J. N., Gelman, L., Rossi, D., Zoete, V., Métivier, R., Tudor, C., ... Desvergne, B. (2007). The Endocrine Disruptor Monoethyl-hexyl-phthalate Is a Selective Peroxisome Proliferator-activated Receptor Modulator That Promotes Adipogenesis *. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(26), 19152–19166. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702724200>
- Glatz, J. F., Jacobs, A. E., & Veerkamp, J. H. (1984). Fatty acid oxidation in human and rat heart. Comparison of cell-free and cellular systems. *Biochim Biophys Acta*, 794(3), 454–465.

- Green, R., Hauser, R., Calafat, A. M., Weuve, J., Schettler, T., Ringer, S., ... Hu, H. (2005). Use of di(2-ethylhexyl) phthalate-containing medical products and urinary levels of mono(2-ethylhexyl) phthalate in neonatal intensive care unit infants. *Environmental Health Perspectives*, 113(9), 1222–1225. <https://doi.org/10.1289/ehp.7932>
- Grün, F., & Blumberg, B. (2006). Environmental Obesogens: Organotins and Endocrine Disruption via Nuclear Receptor Signaling. *Endocrinology*, 147(6), s50–s55. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1129>
- Health Canada. (2021, December 14). Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in Canadians . Retrieved November 7, 2022, from Environmental and Workplace Health website: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/environmental-workplace-health/reports-publications/environmental-contaminants/human-biomonitoring-resources/2-ethylhexyl-phthalate-canadians.html>
- Kan, C. F. K., Singh, A. B., Stafforini, D. M., Azhar, S., & Liu, J. (2014). Arachidonic acid downregulates acyl-CoA synthetase 4 expression by promoting its ubiquitination and proteasomal degradation[S]. *Journal Lipid Research*, 55, 1657–1667. <https://doi.org/10.1194/jlr.M045971>
- Kavlock, R., Barr, D., Boekelheide, K., Breslin, W., Breysse, P., Chapin, R., ... Williams, P. (2006). NTP-CERHR Expert Panel Update on the Reproductive and Developmental Toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 22(3), 291–399. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17068859>
- Kavlock, R., Boekelheide, K., Chapin, R., Cunningham, M., Faustman, E., Foster, P., ... Zacharewski, T. (2002). NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction:

phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Reproductive Toxicology*, 16, 529–653. Retrieved from https://journals-scholarsportal-info.proxy.bib.uottawa.ca/pdf/08906238/v16i0005/529_ncfteoadtodp.xml

Kelley, D. E., Goodpaster, B., Wing, R. R., & Simoneau, J. A. (1999). Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *The American Journal of Physiology*, 277(6), E1130–E1141. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.1999.277.6.E1130>

Killion, E. A., Reeves, A. R., El Azzouny, M. A., Yan, Q.-W., Surujon, D., Griffin, J. D., ... Greenberg, A. S. (2018). A role for long-chain acyl-CoA synthetase-4 (ACSL4) in diet-induced phospholipid remodeling and obesity-associated adipocyte dysfunction. *Molecular Metabolism*, 9, 43–56. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.01.012>

Kim, J.-H., Lewin, T. M., & Coleman, R. A. (2001). Expression and Characterization of Recombinant Rat Acyl-CoA Synthetases 1, 4, and 5 selective inhibition by triacsin C and thiazolidinediones. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(27), 24667–24673. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010793200>

Kim KN, Lee MR, Choi YH, Hwang H, Oh SY, Park C, H. Y. (2016). Association between phthalate exposure and lower handgrip strength in an elderly population: a repeated-measures study. *Environmental Health*, 15(1), 93.

Kitzmann, M., Lantier, L., Hébrard, S., Mercier, J., Foretz, M., & Aguer, C. (2011). Abnormal metabolism flexibility in response to high palmitate concentrations in myotubes derived from obese type 2 diabetic patients. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of*

- Disease*, 1812(4), 423–430. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.12.007>
- Kladnicka, I., Bludovska, M., Plavinova, I., Muller, L., & Mullerova, D. (2022). Obesogens in Foods. *Biomolecules*, 12(680), 1–18. <https://doi.org/10.3390/biom12050680>
- Koch, H. M., Preuss, R., & Angerer, J. (2006). Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure - an update and latest results1. *International Journal of Andrology*, 29(1), 155–165. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00607.x>
- Kotlyar, M., & Carson, S. W. (1999). Effects of obesity on the cytochrome P450 enzyme system. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 37(1), 8–19.
- Koves, T. R., Li, P., An, J., Akimoto, T., Slentz, D., Ilkayeva, O., ... Muoio, D. M. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator 1 γ -mediated metabolic remodeling of skeletal myocytes mimics exercise training and reverses lipid-induced mitochondrial inefficiency. *Journal of Biological Chemistry*, 280(39), 33588–33598. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507621200>
- Koves, T. R., Ussher, J. R., Noland, R. C., Slentz, D., Mosedale, M., Ilkayeva, O., ... Muoio, D. M. (2008). Mitochondrial Overload and Incomplete Fatty Acid Oxidation Contribute to Skeletal Muscle Insulin Resistance. *Cell Metabolism*, 7(1), 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.013>
- Krebs, H. A. (1970). The History of the Tricarboxylic Acid Cycle. *Perspectives in Biology and Medicine*, 14(1), 24. <https://doi.org/10.1353/pbm.1970.0001>
- Kuerschner, L., Moessinger, C., & Thiele, C. (2008). Imaging of Lipid Biosynthesis: How a Neutral Lipid Enters Lipid Droplets. *Traffic*, 9(3), 338–352. <https://doi.org/10.1111/J.1600->

0854.2007.00689.X

- Kuwata, H., & Hara, S. (2019). Role of acyl-CoA synthetase ACSL4 in arachidonic acid metabolism. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, *144*, 106363.
<https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2019.106363>
- Kuwata, H., Yoshimura, M., Sasaki, Y., Yoda, E., Nakatani, Y., Kudo, I., & Hara, S. (2014). Role of long-chain acyl-coenzyme A synthetases in the regulation of arachidonic acid metabolism in interleukin 1 β -stimulated rat fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1841*(1), 44–53.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.09.015>
- Lagerstedt, S. A., Hinrichs, D. R., Batt, S. M., Magera, M. J., Rinaldo, P., & McConnell, J. P. (2001). Quantitative Determination of Plasma C8–C26 Total Fatty Acids for the Biochemical Diagnosis of Nutritional and Metabolic Disorders. *Molecular Genetics and Metabolism*, *73*(1), 38–45. <https://doi.org/10.1006/mgme.2001.3170>
- Lv, Z., Cheng, J., Huang, S., Zhang, Y., Wu, S., Qiu, Y., ... Ke, Y. (2016). DEHP induces obesity and hypothyroidism through both central and peripheral pathways in C3H/He mice. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, *24*(2), 368–378. <https://doi.org/10.1002/oby.21359>
- Markworth, J. F., Mitchell, C. J., D'Souza, R. F., Aasen, K. M. M., Durainayagam, B. R., Mitchell, S. M., ... Cameron-Smith, D. (2018). Arachidonic acid supplementation modulates blood and skeletal muscle lipid profile with no effect on basal inflammation in resistance exercise trained men. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, *128*, 74–86. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2017.12.003>
- Mogensen, M., Sahlin, K., Fernstrom, M., Glintborg, D., Vind, B. F., Beck-Nielsen, H., &

- Hojlund, K. (2007). Mitochondrial respiration is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, *56*(6), 1592–1599. <https://doi.org/10.2337/db06-0981>
- Mootha, V. K., Lindgren, C. M., Eriksson, K. F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., ... Groop, L. C. (2003). PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature Genetics*, *34*(3), 267–273. <https://doi.org/10.1038/ng1180>
- Patti, M. E., Butte, A. J., Crunkhorn, S., Cusi, K., Berria, R., Kashyap, S., ... Mandarino, L. J. (2003). Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(14), 8466–8471. <https://doi.org/10.1073/pnas.1032913100>
- Perdomo, G., Commerford, S. R., Richard, A.-M. T., Adams, S. H., Corkey, B. E., O'Doherty, R. M., & Brown, N. F. (2004). Increased β -Oxidation in Muscle Cells Enhances Insulin-stimulated Glucose Metabolism and Protects against Fatty Acid-induced Insulin Resistance Despite Intramyocellular Lipid Accumulation. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(26), 27177–27186. <https://doi.org/10.1074/JBC.M403566200>
- Petersen, K. F., Dufour, S., Befroy, D., Garcia, R., & Shulman, G. I. (2004). Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *The New England Journal of Medicine*, *350*(7), 664–671. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa031314>
- Phielix, E., Schrauwen-Hinderling, V. B., Mensink, M., Lenaers, E., Meex, R., Hoeks, J., ... Schrauwen, P. (2008). Lower intrinsic ADP-stimulated mitochondrial respiration underlies in vivo mitochondrial dysfunction in muscle of male type 2 diabetic patients. *Diabetes*,

57(11), 2943–2949. <https://doi.org/10.2337/db08-0391>

- Pradhan, A., Olsson, P. E., & Jass, J. (2018). Di(2-ethylhexyl) phthalate and diethyl phthalate disrupt lipid metabolism, reduce fecundity and shortens lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere*, *190*, 375–382. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2017.09.123>
- Rajkumar, A., Lamothe, G., Bolongo, P., Harper, M.-E., Adamo, K., Doucet, É., ... Tesson, F. (2016). Acyl-CoA synthetase long-chain 5 genotype is associated with body composition changes in response to lifestyle interventions in postmenopausal women with overweight and obesity: a genetic association study on cohorts Montréal-Ottawa New Emerging Team, and. *BMC Medical Genetics*, *17*(56), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12881-016-0320-4>
- Rajkumar, A., Liaghati, A., Chan, J., Lamothe, G., Dent, R., Doucet, É., ... Tesson, F. (2018). ACSL5 genotype influence on fatty acid metabolism: a cellular, tissue, and whole-body study. *Metabolism Journal*, *83*, 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.03.019>
- Rett, B. S., & Whelan, J. (2011). Increasing dietary linoleic acid does not increase tissue arachidonic acid content in adults consuming Western-type diets: A systematic review. *Nutrition and Metabolism*, Vol. 8. <https://doi.org/10.1016/j.cnsns.2012.03.001>
- Rowdhwal, S. S. S., & Chen, J. (2018). Toxic Effects of Di-2-ethylhexyl Phthalate: An Overview. *BioMed Research International*, *2018*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2018/1750368>
- Smerieri, A., Testa, C., Lazzeroni, P., Nuti, F., Grossi, E., Cesari, S., ... Street, M. E. (2015). Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate Metabolites in Urine Show Age-Related Changes and Associations with Adiposity and Parameters of Insulin Sensitivity in Childhood. *Plos One*, *10*(2), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117831>

- Sparks, L. M., Xie, H., Koza, R. A., Mynatt, R., Hulver, M. W., Bray, G. A., & Smith, S. R. (2005). A High-Fat Diet Coordinately Downregulates Genes Required for Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Skeletal Muscle. In *Diabetes* (Vol. 54). Retrieved from <http://diabetes.diabetesjournals.org>.
- Stahlhut, R. W., van Wijngaarden, E., Dye, T. D., Cook, S., & Swan, S. H. (2007). Concentrations of urinary phthalate metabolites are associated with increased waist circumference and insulin resistance in adult U.S. males. *Environmental Health Perspectives*, *115*(6), 876–882. <https://doi.org/10.1289/ehp.9882>
- Teng, A. C. T., Adamo, K., Tesson, F., & Stewart, A. F. R. (2009). Functional characterization of a promoter polymorphism that drives ACSL5 gene expression in skeletal muscle and associates with diet-induced weight loss. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *23*(6), 1705–1709. <https://doi.org/10.1096/fj.08-120998>
- US Food and Drug Administration. (2001). Safety assessment of Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) released from PVC medical devices. *Center for Devices and Radiological Health*, 119.
- Veerkamp, J. H., Van Moerkerk, H. T., Glatz, J. F., & Van Hinsbergh, V. W. (1983). Incomplete palmitate oxidation in cell-free systems of rat and human muscles. *Biochimica et Biophysica Acta*, *753*, 399–410.
- Wang, L., Manson, J. E., Rautiainen, S., Gaziano, T. J., Michael, B., Buring, J. E., Tsai, M. Y., & Sesso, H. D. (2016). A prospective study of erythrocyte polyunsaturated fatty acid, weight gain, and risk of becoming overweight or obese in middle-aged and older women. *European*

Journal of Nutrition, 55, 687–697. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-0889-y>

Winberg, L. D., & Badr, M. Z. (1995). Mechanism of phthalate-induced inhibition of hepatic mitochondrial beta-oxidation. *Toxicology Letters*, 76(1), 63–69.

Xu, X., Gopalacharyulu, P., Seppänen-Laakso, T., Ruskeepää, A.-L., Aye, C. C., Carson, B. P., ... Teleman, A. A. (2012). Insulin Signaling Regulates Fatty Acid Catabolism at the Level of CoA Activation. *PLoS Genetics*, 8(1), e1002478.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002478>

Yaghjian, L., Sites, S., Ruan, Y., & Chang, S.-H. (2015). Associations of urinary phthalates with body mass index, waist circumference and serum lipids among females: National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2004. *Int J of Obes*, 39(6), 994–1000.

<https://doi.org/10.1038/ijo.2015.8>

Zeman, M., Vecka, M., Jáchymová, M., Jiráček, R., Tvrzická, E., Staňková, B., & Žák, A. (2009). FACL4 Polymorphism in Metabolic Syndrome and Depression 287 287 Fatty Acid CoA Ligase-4 Gene Polymorphism Influences Fatty Acid Metabolism in Metabolic Syndrome, but not in Depression. *Tohoku J. Exp. Med*, 217(4), 287–293.

Zhang, Y., Wang, S., Zhao, T., Yang, L., Guo, S., Shi, Y., ... Ye, L. (2019). Mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) promoted lipid accumulation via JAK2/STAT5 and aggravated oxidative stress in BRL-3A cells. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 184, 1–8. Retrieved from <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S014765131930942X?token=FE85E2E91673B4AD9081AB6E0F717DE9E7D6D36291793A3975065D672ABD01404EFB8C818A9BCC029214FCCD0B1FFD5A&originRegion=us-east-1&originCreation=20211124175327>

Zhao, L., Pascual, F., Bacudio, L., Suchanek, A. L., Young, P. A., Li, L. O., ... Carman, G. M.

(2019). Defective fatty acid oxidation in mice with muscle-specific acyl-CoA synthetase 1 deficiency increases amino acid use and impairs muscle function. *Journal of Biological Chemistry*, 294(22), 8819–8833. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006790>

Zhou, L., Vessby, B., & Nilsson, A. (2002). Quantitative Role of Plasma Free Fatty Acids in the Supply of Arachidonic Acid to Extrahepatic Tissues in Rats. *The Journal of Nutrition*, 132(9), 2626–2631. <https://doi.org/10.1093/jn/132.9.2626>

Tables

Table 1: Characteristics of women with obesity enrolled in NHANES 2003-2004

Variable	Number (n)	Mean	Standard Deviation (SD)
Age (yr)	89	46.66	18.64
BMI (kg/m ²)	87	35.94	5.17
MEHP (ng/ml)	88	7.85	13.72
Gamma-Linolenic Acid (μmol/l)	88	50.91	21.77
Arachidonic Acid (μmol/l)	88	880.4	221.0

Table 2: Backward regression analysis studying the modulators of plasma omega-6 fatty acid (Arachidonic Acid (AA) and Gamma-Linolenic Acid (GLA)) levels within adult women with obesity who participated in NHANES 2003-2004 study

Dependent Variable	Independent Variable /Term	Unstandardized Coefficient	Standard Error	Cohen's f ²	Variable p-value	r ² adjusted model	Model p-value
AA	Constant	649.7	64.5	-	0.000	0.3465	0.000
	Age	3.57	1.22	0.064	0.004		
	MEHP	7.62	1.73	0.212	0.000		
	Ethnicity			0.109	0.003		
	Non-Hispanic Black	81.4	46.1		0.082		
	Mexican American	-102.3	66.4		0.127		
	Other Hispanic	-364	132		0.007		
GLA	Constant	35.84	6.81	-	0.000	0.235	0.000
	Age	0.386	0.129	0.079	0.004		
	MEHP	0.436	0.182	0.056	0.019		
	Ethnicity			0.528	0.049		
	Non-Hispanic Black	-8.42	4.87		0.088		
	Mexican American	-14.60	7.01		0.041		
	Other Hispanic	-25.1	13.9		0.076		

Figure Legends

Fig.1 MEHP cytotoxicity in C2C12 myotubes - Differentiated myotubes were exposed to varying concentrations of MEHP (10, 100 and 300 μM) for 24 hours followed by staining with Hoechst 33342 and Propidium Iodide (PI), both DNA staining dyes. Cells that have undergone apoptosis display nuclei condensation, which is detected via Hoechst 33342, while apoptotic and necrotic cells would be detected by PI, which is unable to cross the membrane of live cells. No significant difference in cytotoxicity was detected between varying concentrations of MEHP exposure to C2C12 myotubes as seen on bar graph (cell death being less than 5% for all conditions). Images were taken at 20x with Zeiss AxioObserver.D1 Microscope (n=3; 6 images/condition taken with 20x objective)

Fig.2 Effects of MEHP on C2C12 myotube fatty acid oxidation and mitochondrial respiration- Differentiated myotubes were exposed to varying concentrations of MEHP (10, 100 and 300 μM) for 24 hours. a) Assessment of total fatty acid oxidation by measuring palmitate-driven exogenous fatty acid oxidation after incubation with radiolabelled ^{14}C -palmitate. n=3. b and c) Fatty acid oxidation assays by measuring mitochondrial oxygen consumption rate (OCR) in presence of palmitate (n=3). Represented in both a time course plot (b) and quantitative graph (c) * represents $p < 0.05$

Fig.3 Assessment of the effects of MEHP on cellular glycolysis levels in the presence of exogenous glucose- Differentiated myotubes seeded onto XF96-well plates were exposed to varying concentrations of MEHP (10, 50, 100 and 300 μM) for 24 hours. Extracellular acidification rate (ECAR) was assessed using the Seahorse XF Cell Glycolysis Stress Test (n=5)

Fig.4 The effects of MEHP on lipids accumulation in C2C12 myoblasts-Lipids quantification

analyses on whole-cell lysates from C2C12 myoblasts exposed to varying concentrations of MEHP (10, 50, 100 and 300 μM) for 24 hours (n=3)

Fig.5 The effects of MEHP on ACSL4 and ACSL5 levels in C2C12 myoblasts-Western blot analyses on whole-cell lysates from C2C12 myoblasts exposed to varying concentrations of MEHP (0,10, 50, 100, 150 and 300 μM) for 24 hours (n \geq 3) * represents p<0.05

Figures

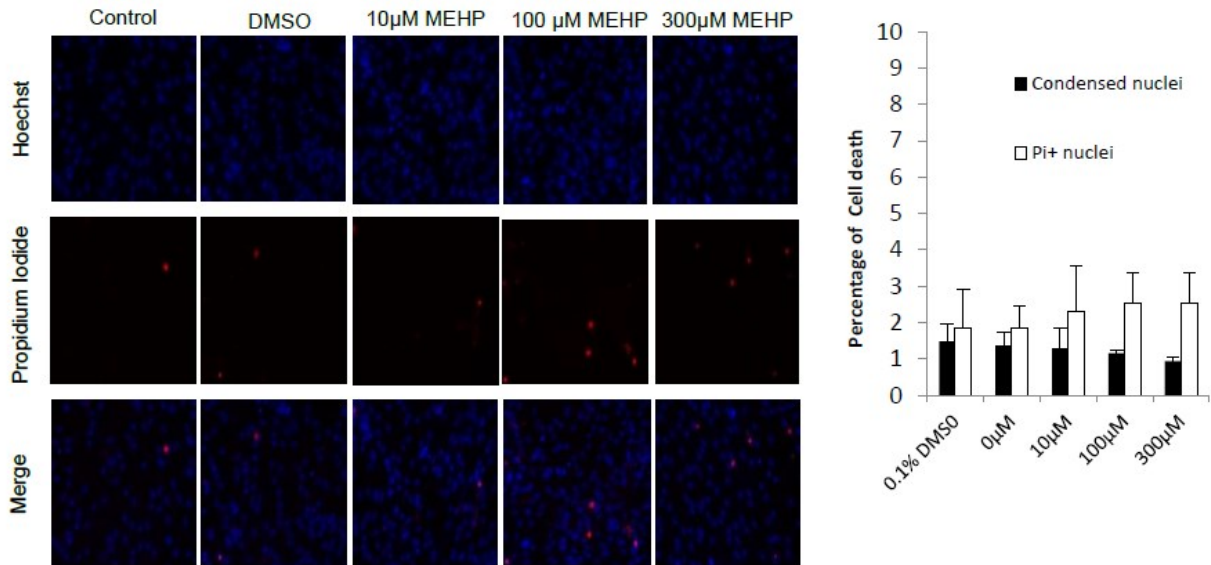
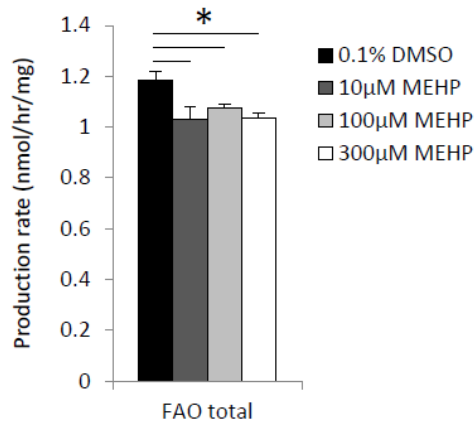
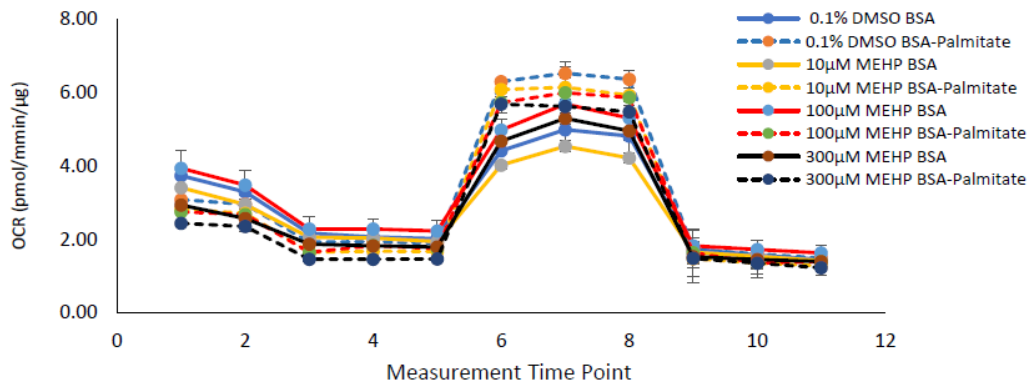


Fig.1

a)



b)



c)

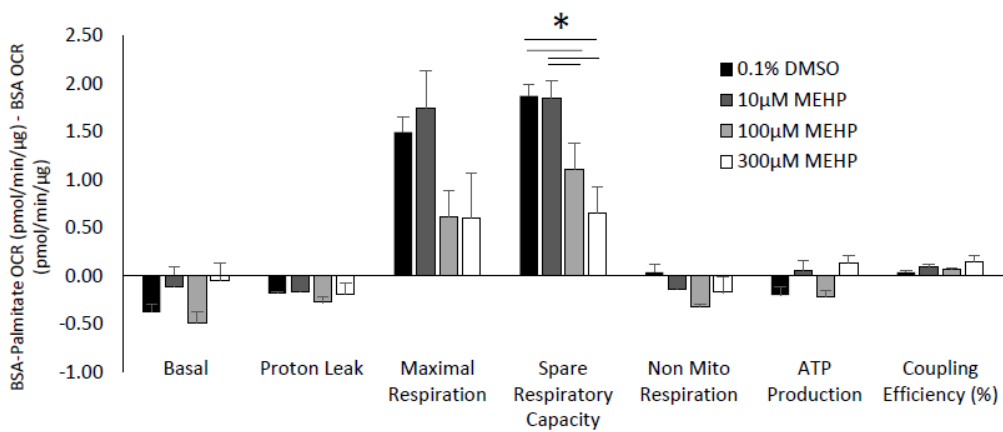


Fig.2

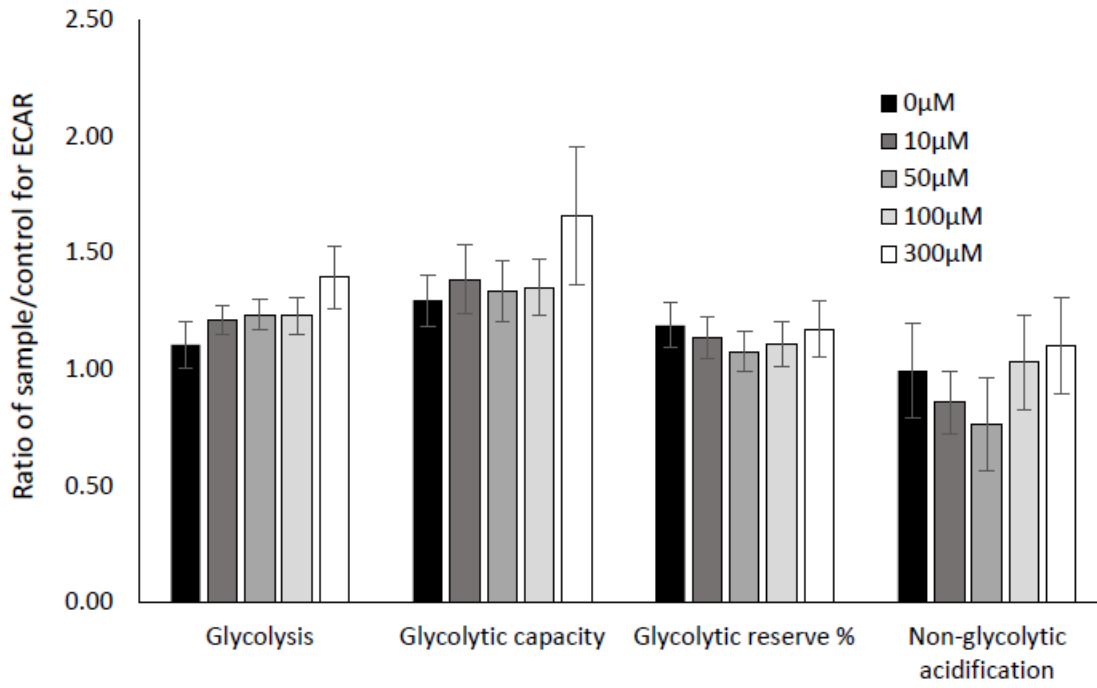


Fig.3

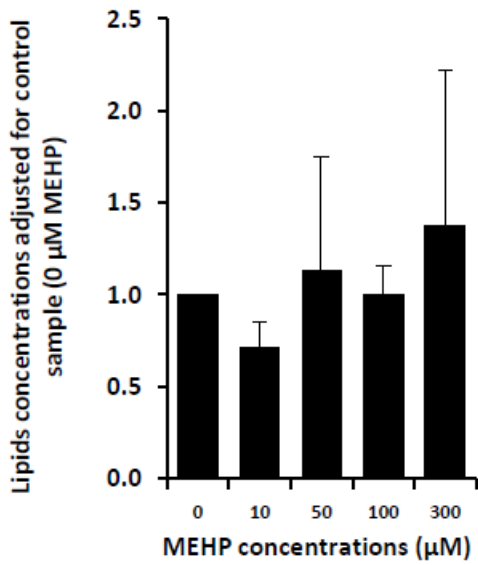


Fig.4

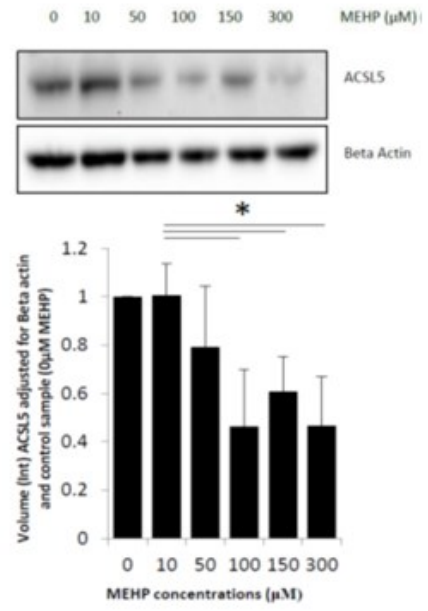
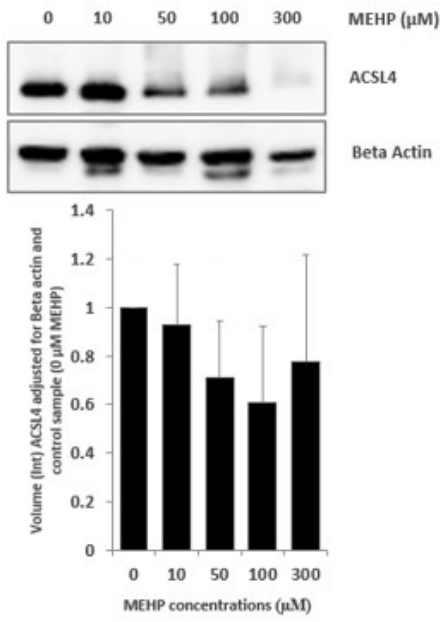


Fig.5

ANNEXE B: Permissions

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Dec 08, 2022

This Agreement between Mrs. Barrakatou Ligali Cisse ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	5443250947168
License date	Dec 08, 2022
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Elsevier Books
Licensed Content Title	Progress in Molecular Biology and Translational Science
Licensed Content Author	Robert C. Noland
Licensed Content Date	Jan 1, 2015
Licensed Content Pages	36
Start Page	39
End Page	74
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables /illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier chapter?	No
Will you be translating?	Yes, including English rights
Number of translations	1
Title	Les Acyl-CoA Synthétases Longues Chaînes (ACSL): leur rôle dans la réponse du myoblaste squelettique au Mono-(2 Éthyl Hexyl) Phtalate (MEHP)
Institution name	University of Ottawa
Expected presentation date	Jan 2023
Portions	Figure 1 on page 44 (chapter 3)
Specific Languages	French-English
Requestor Location	Mrs. Barrakatou Ligali Cisse 451 Smyth road Ottawa, ON K1H 8M5 Canada Attn: Mrs. Barrakatou Ligali Cisse
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 CAD
Terms and Conditions	

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and

that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. **Acknowledgement:** If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. **Altering/Modifying Material:** Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier's permissions helpdesk [here](#)). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. **Reservation of Rights:** Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. **License Contingent Upon Payment:** While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. **Warranties:** Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. **Indemnity:** You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. **No Transfer of License:** This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. **No Amendment Except in Writing:** This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. **Objection to Contrary Terms:** Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. **Revocation:** Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.). Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
 - via their non-commercial person homepage or blog
 - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
 - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
 - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
 - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
 - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
 - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [CrossMark logo](#), the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting policy](#) for further information.

18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. Thesis/Dissertation: If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. Other Conditions:

v1.10

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Dec 08, 2022

This Agreement between Mrs. Barrakatou Ligali Cisse ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	5443180371380
License date	Dec 08, 2022
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Cellular and Molecular Life Sciences
Licensed Content Title	Lipid sensing and lipid sensors
Licensed Content Author	C. Wolfrum
Licensed Content Date	Sep 17, 2007
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables /illustrations	1
Will you be translating?	no
Circulation/distribution	1 - 29
Author of this Springer Nature content	no
Title	Les Acyl-CoA Synthétases Longues Chaînes (ACSL): leur rôle dans la réponse du myoblaste squelettique au Mono-(2 Éthyl Hexyl) Phtalate (MEHP)
Institution name	University of Ottawa
Expected presentation date	Jan 2023
Portions	Figure 2 on page 2471
Requestor Location	Mrs. Barrakatou Ligali Cisse 451 Smyth road Ottawa, ON K1H 8M5 Canada Attn: Mrs. Barrakatou Ligali Cisse
Total	0.00 CAD

Terms and Conditions

Springer Nature Customer Service Centre GmbH Terms and Conditions

The following terms and conditions ("Terms and Conditions") together with the terms specified in your [RightsLink] constitute the License ("License") between you as Licensee and Springer Nature Customer Service Centre GmbH as Licensor. By clicking 'accept' and completing the transaction for your use of the material ("Licensed Material"), you confirm your acceptance of and obligation to be bound by these Terms and Conditions.

1. Grant and Scope of License

- 1.1. The Licensor grants you a personal, non-exclusive, non-transferable, non-sublicensable, revocable, world-wide

License to reproduce, distribute, communicate to the public, make available, broadcast, electronically transmit or create derivative works using the Licensed Material for the purpose(s) specified in your RightsLink Licence Details only. Licenses are granted for the specific use requested in the order and for no other use, subject to these Terms and Conditions. You acknowledge and agree that the rights granted to you under this License do not include the right to modify, edit, translate, include in collective works, or create derivative works of the Licensed Material in whole or in part unless expressly stated in your RightsLink Licence Details. You may use the Licensed Material only as permitted under this Agreement and will not reproduce, distribute, display, perform, or otherwise use or exploit any Licensed Material in any way, in whole or in part, except as expressly permitted by this License.

1. 2. You may only use the Licensed Content in the manner and to the extent permitted by these Terms and Conditions, by your RightsLink Licence Details and by any applicable laws.

1. 3. A separate license may be required for any additional use of the Licensed Material, e.g. where a license has been purchased for print use only, separate permission must be obtained for electronic re-use. Similarly, a License is only valid in the language selected and does not apply for editions in other languages unless additional translation rights have been granted separately in the License.

1. 4. Any content within the Licensed Material that is owned by third parties is expressly excluded from the License.

1. 5. Rights for additional reuses such as custom editions, computer/mobile applications, film or TV reuses and/or any other derivative rights requests require additional permission and may be subject to an additional fee. Please apply to journalpermissions@springernature.com or bookpermissions@springernature.com for these rights.

2. Reservation of Rights

Licensor reserves all rights not expressly granted to you under this License. You acknowledge and agree that nothing in this License limits or restricts Licensor's rights in or use of the Licensed Material in any way. Neither this License, nor any act, omission, or statement by Licensor or you, conveys any ownership right to you in any Licensed Material, or to any element or portion thereof. As between Licensor and you, Licensor owns and retains all right, title, and interest in and to the Licensed Material subject to the license granted in Section 1.1. Your permission to use the Licensed Material is expressly conditioned on you not impairing Licensor's or the applicable copyright owner's rights in the Licensed Material in any way.

3. Restrictions on use

3. 1. Minor editing privileges are allowed for adaptations for stylistic purposes or formatting purposes provided such alterations do not alter the original meaning or intention of the Licensed Material and the new figure(s) are still accurate and representative of the Licensed Material. Any other changes including but not limited to, cropping, adapting, and/or omitting material that affect the meaning, intention or moral rights of the author(s) are strictly prohibited.

3. 2. You must not use any Licensed Material as part of any design or trademark.

3. 3. Licensed Material may be used in Open Access Publications (OAP), but any such reuse must include a clear acknowledgment of this permission visible at the same time as the figures/tables/illustration or abstract and which must indicate that the Licensed Material is not part of the governing OA license but has been reproduced with permission. This may be indicated according to any standard referencing system but must include at a minimum 'Book/Journal title, Author, Journal Name (if applicable), Volume (if applicable), Publisher, Year, reproduced with permission from SNCSC'.

4. STM Permission Guidelines

4. 1. An alternative scope of license may apply to signatories of the STM Permissions Guidelines ("STM PG") as amended from time to time and made available at <https://www.stm-assoc.org/intellectual-property/permissions/permissions-guidelines/>.

4. 2. For content reuse requests that qualify for permission under the STM PG, and which may be updated from time to time, the STM PG supersede the terms and conditions contained in this License.

4. 3. If a License has been granted under the STM PG, but the STM PG no longer apply at the time of publication,

further permission must be sought from the Rightsholder. Contact journalpermissions@springernature.com or bookpermissions@springernature.com for these rights.

5. Duration of License

5. 1. Unless otherwise indicated on your License, a License is valid from the date of purchase ("License Date") until the end of the relevant period in the below table:

Reuse in a medical communications project	Reuse up to distribution or time period indicated in License
Reuse in a dissertation/thesis	Lifetime of thesis
Reuse in a journal/magazine	Lifetime of journal/magazine
Reuse in a book/textbook	Lifetime of edition
Reuse on a website	1 year unless otherwise specified in the License
Reuse in a presentation/slide kit/poster	Lifetime of presentation/slide kit/poster. Note: publication whether electronic or in print of presentation/slide kit/poster may require further permission.
Reuse in conference proceedings	Lifetime of conference proceedings
Reuse in an annual report	Lifetime of annual report
Reuse in training/CME materials	Reuse up to distribution or time period indicated in License
Reuse in newsmedia	Lifetime of newsmedia
Reuse in coursepack/classroom materials	Reuse up to distribution and/or time period indicated in license

6. Acknowledgement

6. 1. The Licensor's permission must be acknowledged next to the Licensed Material in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figures/tables/illustrations or abstract and must be hyperlinked to the journal/book's homepage.

6. 2. Acknowledgement may be provided according to any standard referencing system and at a minimum should include "Author, Article/Book Title, Journal name/Book imprint, volume, page number, year, Springer Nature".

7. Reuse in a dissertation or thesis

7. 1. Where 'reuse in a dissertation/thesis' has been selected, the following terms apply: Print rights of the Version of Record are provided for; electronic rights for use only on institutional repository as defined by the Sherpa guideline (www.sherpa.ac.uk/romeo/) and only up to what is required by the awarding institution.

7. 2. For theses published under an ISBN or ISSN, separate permission is required. Please contact journalpermissions@springernature.com or bookpermissions@springernature.com for these rights.

7. 3. Authors must properly cite the published manuscript in their thesis according to current citation standards and include the following acknowledgement: '*Reproduced with permission from Springer Nature*'.

8. License Fee

You must pay the fee set forth in the License Agreement (the "License Fees"). All amounts payable by you under this License are exclusive of any sales, use, withholding, value added or similar taxes, government fees or levies or other assessments. Collection and/or remittance of such taxes to the relevant tax authority shall be the responsibility of the party who has the legal obligation to do so.

9. Warranty

9. 1. The Licensor warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of the Licensed

Material. You are solely responsible for ensuring that the material you wish to license is original to the Licensor and does not carry the copyright of another entity or third party (as credited in the published version). If the credit line on any part of the Licensed Material indicates that it was reprinted or adapted with permission from another source, then you should seek additional permission from that source to reuse the material.

9. 2. EXCEPT FOR THE EXPRESS WARRANTY STATED HEREIN AND TO THE EXTENT PERMITTED BY APPLICABLE LAW, LICENSOR PROVIDES THE LICENSED MATERIAL "AS IS" AND MAKES NO OTHER REPRESENTATION OR WARRANTY. LICENSOR EXPRESSLY DISCLAIMS ANY LIABILITY FOR ANY CLAIM ARISING FROM OR OUT OF THE CONTENT, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO ANY ERRORS, INACCURACIES, OMISSIONS, OR DEFECTS CONTAINED THEREIN, AND ANY IMPLIED OR EXPRESS WARRANTY AS TO MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. IN NO EVENT SHALL LICENSOR BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, OR EXEMPLARY DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, VIEWING OR USE OF THE LICENSED MATERIAL REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION APPLIES NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

10. Termination and Cancellation

10. 1. The License and all rights granted hereunder will continue until the end of the applicable period shown in Clause 5.1 above. Thereafter, this license will be terminated and all rights granted hereunder will cease.

10. 2. Licensor reserves the right to terminate the License in the event that payment is not received in full or if you breach the terms of this License.

11. General

11. 1. The License and the rights and obligations of the parties hereto shall be construed, interpreted and determined in accordance with the laws of the Federal Republic of Germany without reference to the stipulations of the CISG (United Nations Convention on Contracts for the International Sale of Goods) or to Germany's choice-of-law principle.

11. 2. The parties acknowledge and agree that any controversies and disputes arising out of this License shall be decided exclusively by the courts of or having jurisdiction for Heidelberg, Germany, as far as legally permissible.

11. 3. This License is solely for Licensor's and Licensee's benefit. It is not for the benefit of any other person or entity.

Questions? For questions on Copyright Clearance Center accounts or website issues please contact springernaturesupport@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777. For questions on Springer Nature licensing please visit <https://www.springernature.com/gp/partners/rights-permissions-third-party-distribution>

Other Conditions:

Version 1.4 - Dec 2022

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Dec 08, 2022

This Agreement between Mrs. Barrakatou Ligali Cisse ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	5443170328554
License date	Dec 08, 2022
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Molecular Neurobiology
Licensed Content Title	The Carnitine Palmitoyl Transferase (CPT) System and Possible Relevance for Neuropsychiatric and Neurological Conditions
Licensed Content Author	Ashraf Virmani et al
Licensed Content Date	Jun 4, 2015
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables /illustrations	1
Will you be translating?	no
Circulation/distribution	1 - 29
Author of this Springer Nature content	no
Title	Les Acyl-CoA Synthétases Longues Chaînes (ACSL): leur rôle dans la réponse du myoblaste squelettique au Mono-(2 Éthyl Hexyl) Phtalate (MEHP)
Institution name	University of Ottawa
Expected presentation date	Jan 2023
Portions	Figure 3 on page 829
Requestor Location	Mrs. Barrakatou Ligali Cisse 451 Smyth road Ottawa, ON K1H 8M5 Canada Attn: Mrs. Barrakatou Ligali Cisse
Total	0.00 CAD

Terms and Conditions

Springer Nature Customer Service Centre GmbH Terms and Conditions

The following terms and conditions ("Terms and Conditions") together with the terms specified in your [RightsLink] constitute the License ("License") between you as Licensee and Springer Nature Customer Service Centre GmbH as Licensor. By clicking 'accept' and completing the transaction for your use of the material ("Licensed Material"), you confirm your acceptance of and obligation to be bound by these Terms and Conditions.

1. Grant and Scope of License

1. 1. The Licensor grants you a personal, non-exclusive, non-transferable, non-sublicensable, revocable, world-wide License to reproduce, distribute, communicate to the public, make available, broadcast, electronically transmit or create derivative works using the Licensed Material for the purpose(s) specified in your RightsLink Licence Details only. Licenses are granted for the specific use requested in the order and for no other use, subject to these Terms and Conditions. You acknowledge and agree that the rights granted to you under this License do not include the right to modify, edit, translate, include in collective works, or create derivative works of the Licensed Material in whole or in part unless expressly stated in your RightsLink Licence Details. You may use the Licensed Material only as permitted under this Agreement and will not reproduce, distribute, display, perform, or otherwise use or exploit any Licensed Material in any way, in whole or in part, except as expressly permitted by this License.

1. 2. You may only use the Licensed Content in the manner and to the extent permitted by these Terms and Conditions, by your RightsLink Licence Details and by any applicable laws.

1. 3. A separate license may be required for any additional use of the Licensed Material, e.g. where a license has been purchased for print use only, separate permission must be obtained for electronic re-use. Similarly, a License is only valid in the language selected and does not apply for editions in other languages unless additional translation rights have been granted separately in the License.

1. 4. Any content within the Licensed Material that is owned by third parties is expressly excluded from the License.

1. 5. Rights for additional reuses such as custom editions, computer/mobile applications, film or TV reuses and/or any other derivative rights requests require additional permission and may be subject to an additional fee. Please apply to journalpermissions@springernature.com or bookpermissions@springernature.com for these rights.

2. Reservation of Rights

Licensor reserves all rights not expressly granted to you under this License. You acknowledge and agree that nothing in this License limits or restricts Licensor's rights in or use of the Licensed Material in any way. Neither this License, nor any act, omission, or statement by Licensor or you, conveys any ownership right to you in any Licensed Material, or to any element or portion thereof. As between Licensor and you, Licensor owns and retains all right, title, and interest in and to the Licensed Material subject to the license granted in Section 1.1. Your permission to use the Licensed Material is expressly conditioned on you not impairing Licensor's or the applicable copyright owner's rights in the Licensed Material in any way.

3. Restrictions on use

3. 1. Minor editing privileges are allowed for adaptations for stylistic purposes or formatting purposes provided such alterations do not alter the original meaning or intention of the Licensed Material and the new figure(s) are still accurate and representative of the Licensed Material. Any other changes including but not limited to, cropping, adapting, and/or omitting material that affect the meaning, intention or moral rights of the author(s) are strictly prohibited.

3. 2. You must not use any Licensed Material as part of any design or trademark.

3. 3. Licensed Material may be used in Open Access Publications (OAP), but any such reuse must include a clear acknowledgment of this permission visible at the same time as the figures/tables/illustration or abstract and which must indicate that the Licensed Material is not part of the governing OA license but has been reproduced with permission. This may be indicated according to any standard referencing system but must include at a minimum 'Book/Journal title, Author, Journal Name (if applicable), Volume (if applicable), Publisher, Year, reproduced with permission from SNCSC'.

4. STM Permission Guidelines

4. 1. An alternative scope of license may apply to signatories of the STM Permissions Guidelines ("STM PG") as amended from time to time and made available at <https://www.stm-assoc.org/intellectual-property/permissions/permissions-guidelines/>.

4. 2. For content reuse requests that qualify for permission under the STM PG, and which may be updated from time to time, the STM PG supersede the terms and conditions contained in this License.

4. 3. If a License has been granted under the STM PG, but the STM PG no longer apply at the time of publication, further permission must be sought from the Rightsholder. Contact journalpermissions@springernature.com or bookpermissions@springernature.com for these rights.

5. Duration of License

5. 1. Unless otherwise indicated on your License, a License is valid from the date of purchase ("License Date") until the end of the relevant period in the below table:

Reuse in a medical communications project	Reuse up to distribution or time period indicated in License
Reuse in a dissertation/thesis	Lifetime of thesis
Reuse in a journal/magazine	Lifetime of journal/magazine
Reuse in a book/textbook	Lifetime of edition
Reuse on a website	1 year unless otherwise specified in the License
Reuse in a presentation/slide kit/poster	Lifetime of presentation/slide kit/poster. Note: publication whether electronic or in print of presentation/slide kit/poster may require further permission.
Reuse in conference proceedings	Lifetime of conference proceedings
Reuse in an annual report	Lifetime of annual report
Reuse in training/CME materials	Reuse up to distribution or time period indicated in License
Reuse in newsmedia	Lifetime of newsmedia
Reuse in coursepack/classroom materials	Reuse up to distribution and/or time period indicated in license

6. Acknowledgement

6. 1. The Licensor's permission must be acknowledged next to the Licensed Material in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figures/tables/illustrations or abstract and must be hyperlinked to the journal/book's homepage.

6. 2. Acknowledgement may be provided according to any standard referencing system and at a minimum should include "Author, Article/Book Title, Journal name/Book imprint, volume, page number, year, Springer Nature".

7. Reuse in a dissertation or thesis

7. 1. Where 'reuse in a dissertation/thesis' has been selected, the following terms apply: Print rights of the Version of Record are provided for; electronic rights for use only on institutional repository as defined by the Sherpa guideline (www.sherpa.ac.uk/romeo/) and only up to what is required by the awarding institution.

7. 2. For theses published under an ISBN or ISSN, separate permission is required. Please contact journalpermissions@springernature.com or bookpermissions@springernature.com for these rights.

7. 3. Authors must properly cite the published manuscript in their thesis according to current citation standards and include the following acknowledgement: '*Reproduced with permission from Springer Nature*'.

8. License Fee

You must pay the fee set forth in the License Agreement (the "License Fees"). All amounts payable by you under this License are exclusive of any sales, use, withholding, value added or similar taxes, government fees or levies or other assessments. Collection and/or remittance of such taxes to the relevant tax authority shall be the responsibility of the party who has the legal obligation to do so.

9. Warranty

9. 1. The Licensor warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of the Licensed Material. **You are solely responsible for ensuring that the material you wish to license is original to the Licensor and does not carry the copyright of another entity or third party (as credited in the published version).** If the credit line on any part of the Licensed Material indicates that it was reprinted or adapted with permission from another source, then you should seek additional permission from that source to reuse the material.

9. 2. EXCEPT FOR THE EXPRESS WARRANTY STATED HEREIN AND TO THE EXTENT PERMITTED BY APPLICABLE LAW, LICENSOR PROVIDES THE LICENSED MATERIAL "AS IS" AND MAKES NO OTHER REPRESENTATION OR WARRANTY. LICENSOR EXPRESSLY DISCLAIMS ANY LIABILITY FOR ANY CLAIM ARISING FROM OR OUT OF THE CONTENT, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO ANY ERRORS, INACCURACIES, OMISSIONS, OR DEFECTS CONTAINED THEREIN, AND ANY IMPLIED OR EXPRESS WARRANTY AS TO MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. IN NO EVENT SHALL LICENSOR BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, OR EXEMPLARY DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, VIEWING OR USE OF THE LICENSED MATERIAL REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION APPLIES NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

10. Termination and Cancellation

10. 1. The License and all rights granted hereunder will continue until the end of the applicable period shown in Clause 5.1 above. Thereafter, this license will be terminated and all rights granted hereunder will cease.

10. 2. Licensor reserves the right to terminate the License in the event that payment is not received in full or if you breach the terms of this License.

11. General

11. 1. The License and the rights and obligations of the parties hereto shall be construed, interpreted and determined in accordance with the laws of the Federal Republic of Germany without reference to the stipulations of the CISG (United Nations Convention on Contracts for the International Sale of Goods) or to Germany's choice-of-law principle.

11. 2. The parties acknowledge and agree that any controversies and disputes arising out of this License shall be decided exclusively by the courts of or having jurisdiction for Heidelberg, Germany, as far as legally permissible.

11. 3. This License is solely for Licensor's and Licensee's benefit. It is not for the benefit of any other person or entity.

Questions? For questions on Copyright Clearance Center accounts or website issues please contact springernaturesupport@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777. For questions on Springer Nature licensing please visit <https://www.springernature.com/gp/partners/rights-permissions-third-party-distribution>

Other Conditions:

Version 1.4 - Dec 2022

Questions? customer@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.
