



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

**Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires**

**Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux**

**ECOLE DOCTORALE**

**Sciences et Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits et Environnement**

**THESE**

présentée pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Institut National Polytechnique de Lorraine**

Spécialité : **SCIENCES AGRONOMIQUES**

Par

**Balbine A. AMOUSSOU épouse FAGLA**

**Etude des interactions polluants aromatiques polycycliques (HAP)-récepteurs adrénergiques-phospholipides membranaires dans le tissu adipeux**

Soutenue publiquement le 29 Novembre 2010 à 14H dans la salle de Conférences de l'INPL devant la Commission d'Examen :

Membres de jury :

Jacques <b>DELARUE</b>	Professeur de Nutrition à l'Université de Brest, Président de la Société Française de Nutrition	Rapporteur
Denis <b>LAIRON</b>	Directeur de recherche INSERM, Marseille, Président de la FENS (Federation of European Nutrition Science)	Rapporteur
Luc <b>MEJEAN</b>	Professeur Emérite de Nutrition à l'ENSAIA-INPL, Nancy	Directeur de Thèse
Carlos <b>MARQUES</b>	Directeur de recherche à l'Institut Charles Sadron, Strasbourg	Président de jury
Olivier <b>ZIEGLER</b>	Professeur de Nutrition à la Faculté de Médecine de Nancy	Invité
Guido <b>RYCHEN</b>	Professeur à l'ENSAIA-INPL, Directeur de l'URAFPA	Invité
André <b>SCHRÖDER</b>	Chargé de recherche à l'Institut Charles Sadron, Strasbourg	Invité



## SOMMAIRE

Liste des figures	11
Liste des tableaux	13
Liste des abréviations	14
Glossaire	15
Introduction	16
<b>Partie 1.</b>	<b>20</b>
<b>Chapitre 1. Les polluants organiques persistants (POP)</b>	<b>20</b>
<b>A. Propriétés et effets des POP</b>	<b>20</b>
<b>B. Evaluation de la toxicité ; son expression</b>	<b>20</b>
1. Le facteur d'équivalence toxique (TEF)	20
2. La quantité d'équivalence toxique (TEQ)	21
3. Coefficient de partage	21
<b>C. Les polychlorobiphényles ou PCB</b>	<b>27</b>
1. Structures et caractéristiques	27
2. Effets sur la santé	28
3. Voie d'absorption des PCB	28
4. Métabolisme des PCB	29
<b>D. Les polychlorodibenzo-para-dioxines (PCDD) et les polychlorodibenzo-furanes (PCDF)</b>	<b>30</b>
1. Structure et caractéristiques	30
2. Effets sur la santé	31
<b>E. Origine des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)</b>	<b>34</b>
1. Structure et caractéristiques des HAP	34
2. Effets sur la santé	37
3. Mécanisme d'action des HAP	37
4. Métabolisme des HAP	40
5. Métabolisme des xénobiotiques	40
<i>Réactions de phase I</i>	40
<i>Les réactions d'oxydation</i>	40
<i>Les réactions de réduction</i>	40
<i>L'hydrolyse d'un ester et d'une amine</i>	40

<i>Réactions de phase II</i>	41
<i>La conjugaison</i>	40
<b>Partie 1. Les travaux récents...</b>	<b>42</b>
<b>Chapitre 2 : Les travaux de l'équipe</b>	<b>42</b>
1. Travaux sur le tissu adipeux	42
2. Travaux de Grova et coll	42
3. Observation de Philippe Irigaray	42
4. Faits expérimentaux	43
4.1. Les travaux de Plant et de Jimenez	43
4.2. Les travaux de Thèse menés par Philippe Irigaray	44
4.3. Les produits de combustion complète	44
4.4. Modèles de souris transgéniques pour étudier l'obésité	44
4.5. Un impact sur certains gènes	45
4.6. Réaction en chaîne par polymérase	45
4.7. Effet d'un autre activateur de lipolyse	46
4.8. Effet des polluants sur la lipogénèse induite par l'insuline et/ou la prise alimentaire	46
4.9. Effet sur d'autres HAP	46
4.10. Effet d'autres polluants	46
4.11. Lipolyse induite par l'ACTH	46
5. But de la thèse	47
<b>Partie 2. Effets sur les récepteurs</b>	<b>48</b>
<b>Chapitre 1 : A. Les récepteurs adrénergiques (récepteurs membranaires)</b>	<b>48</b>
1. Les récepteurs alpha-adrénergiques (récepteurs membranaires)	49
1.1. Les récepteurs alpha 1-adrénergiques	49
1.2. Les récepteurs alpha 2-adrénergiques	49
2. Les récepteurs bêta-adrénergiques	49
2.1. Les récepteurs bêta1-adrénergiques	49
2.2. Les récepteurs bêta2-adrénergiques	50
3. Rôle des protéines G	50
<b>B. Désensibilisation des récepteurs</b>	<b>55</b>
1. Mécanisme de désensibilisation des récepteurs	55
2. Altérations de la réponse lipolytique aux catécholamines	56
<b>C. Mise en évidence de l'accumulation des polluants HAP sur les récepteurs</b>	<b>57</b>

<b>adrénergiques</b>	
1. Matériels et méthodes	57
1.1. Matériels	57
1.1.1. Etude in vitro de « binding » des récepteurs béta3 en présence de ben[a]pyrène	57
1.1.2. Etude in vitro de l'effet benzo[a]pyrène sur l'activité des récepteurs béta1	58
1.1.3. Etude in vitro de l'effet benzo[a]pyrène sur l'activité des récepteurs béta3	58
1.2. Méthodes	58
1.2.1. Test de fonctionnalités des récepteurs béta1-adrénergiques humains en présence de benzo[a]pyrène	59
1.2.2. Détermination de 100% de production d'AMPC en présence de stimulus 1 nm d'isoprotérénol	59
1.2.3. Analyse et expression des résultats	59
1.3. Résultats et discussion	60
2. Conclusion	63
<b>Partie 3 : Effet membranaire</b>	<b>65</b>
<b>Chapitre 1 : Description de la membrane</b>	<b>65</b>
<b>A. La membrane biologique</b>	<b>65</b>
1. Structure et composition de la membrane biologique	65
2. Membrane et phase de la matière	67
3. Membrane et tension de surface	67
4. Propriétés des membranes	67
4.1. Perméabilité membranaire	67
4.2. Transport passif	69
4.3. Transport actif	69
4.4. Capacité à se sceller	69
5. Canal ionique	69
5.1. Propriétés des canaux ioniques	70
5.2. Rôles physiologiques des canaux ioniques	71
5.3. Diversités moléculaires des canaux ioniques	71
5.4. Biophysique des canaux ioniques	72
6. Transduction du signal	72
6.1. Stimulus d'ouvertures	72
6.2. Messenger secondaire	73

6.2.1. Définition de second messenger	73
6.2.2. Voies faisant intervenir l'AMPc	73
6.2.2.1. L'action du glucagon	75
6.2.2.2. Différentes actions des protéines kinases A (PKA)	75
6.2.2.3. Cas du récepteur $\beta$ -adrénergique des cellules du tissu nodal du cœur	75
3. Voie des phosphatidyl-inositols	78
<b>B. La membrane artificielle</b>	<b>78</b>
1. Les phospholipides ou phosphoglycérolipides	78
1.1. Comportement face à l'eau	79
1.2. Formation d'une couche monomoléculaire	79
1.3. Formation d'une double couche de phospholipides	79
1.4. Formation de liposomes	79
1.5. Lipoprotéine de faible densité (LDL)	80
1.6. Formation de micelles ou des bicouches	80
1.7. L'effet hydrophobe	80
1.8. Les interactions hydrophobes	81
1.9. Principe de formation d'une bicouche	82
1.10. Principe de la diffusion passive	82
1.11. Les membranes phospholipidiques à l'interface air-eau	82
1.12. Paramètres influençant la membrane phospholipidique	83
1.13. Diffusion de petites molécules à travers la bicouche phospholipidique	84
1.14. Diffusion de quelques HAP à travers la bicouche phospholipidique	85
2. Conclusion	85
<b>Partie 3 : Effet membranaire</b>	<b>87</b>
<b>Chapitre 2 : Polluants et membranes modèles</b>	<b>87</b>
<b>A. Accumulation des polluants dans la membrane modèle</b>	<b>87</b>
1. Matériels et méthodes	87
1.1. Matériels	87
1.2. Méthodes	90
1.2.1. Préparation des liposomes	90
1.2.1.1. Préparation de la solution de DOPC en solvant organique	90
1.2.1.2. Préparation des solutions de polluants mélangés avec le DOPC	90
(1ère méthode)	
1.2.1.3. Préparation des solutions de polluants dans le glucose	90

(2ème méthode)	
1.2.1.4. Contrôle des molarités	90
1.2.1.5. Formation de vésicules géantes	90
2. Observation au microscope	91
3. Résultats	94
3.1. Première méthode	96
<i>Vésicules formées à partir d'un mélange de DOPC + polluant</i>	96
3.2. Deuxième méthode	100
<i>Vésicules de DOPC introduites dans une solution aqueuse de polluant</i>	100
4. Conclusion	103
<b>B. Etude des propriétés élastiques des vésicules de DOPC sans ou avec polluants :</b>	<b>104</b>
<b>expériences de micropipette</b>	
1. Matériels et méthodes	105
1.1. Matériels	105
1.2. Méthodes	109
1.2.1. La forge de la micropipette	109
1.2.2. Principe de l'expérience de succion dans une micropipette	119
1.2.3. Calcul des grandeurs caractéristiques de la membrane	111
<i>Calcul de la tension de la membrane</i>	111
<i>Taux d'augmentation de la surface apparente</i>	113
2. Résultats	117
2.1. Etude des propriétés élastiques des vésicules de DOPC par la technique de micro- pipette	117
3. Conclusion	119
<b>C. Titration calorimétrique isotherme</b>	<b>120</b>
1. Principe de la titration calorimétrique isotherme	121
2. Les liposomes	121
3. Matériels et méthodes	122
3.1. Matériels	122
3.1.1. Matériel pour la fabrication des liposomes	122
3.1.2. Matériel pour la caractérisation (mesure) des liposomes	122
3.1.3. Matériel de l'ITC	122
3.2. Méthodes	124
3.2.1. Préparation des liposomes	124

3.2.2. Extrusion des liposomes de DOPC à travers des membranes poreuses calibrées (filtres)	124
3.3. Types d'expériences réalisées	127
3.3.1. Injection de liposomes de DOPC dans une solution de polluant	127
3.3.2. Injection de liposomes mélangés avec du polluant dans l'eau	128
4. Résultats	128
5. Conclusion	130
<b>Discussion-conclusion</b>	<b>131</b>
<b>Annexes</b>	<b>135</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>137</b>
<b>Publications</b>	<b>155</b>
<b>Résumé</b>	<b>157</b>

## Mémoire

En mémoire de toi, ma grand-mère **Guessy TEKO**, tu es la première à avoir compris...

En marchant de Dégouè-Akodéha jusqu'au séminaire Saint-Gall de Ouidah, tu as dit « oui » à la science sans savoir ce qui en était réellement...

A mon grand-père **Adjigo Adjassa AMOUSSOU**...  
La science fera de l'humanité des êtres éclairés...  
Aujourd'hui tu pourras facilement dit « oui »...

A mes grands-parents maternels **Houéhounhoué DOSSOU** et **Hloumin BESSANH**...

En mémoire de toi, mon feu père, **Cakpo Antoine AMOUSSOU**...  
En scolarisant toutes tes filles, tu as été un homme très éclairé de ton temps ...  
Je te dédie ce diplôme de doctorat ; à toi et à tes parents, en signe de ma profonde gratitude pour tous les sacrifices que tu avais consentis.

A toi, mon cher époux, **Benoît** ...  
La femme africaine a besoin de la clairvoyance de son mari et toi, tu en es tout un symbole...

A vous, **Nafi Agboessi Marie-Gorette KEKEREKE**...et **Nanh Dakossi-LOHATODE**...  
Vous êtes toujours restées dans mon cœur !  
Recevez ici l'expression de mes reconnaissances pour l'éducation et l'amour maternel que vous m'avez donnés.

A toi ma maman Chérie, **Messèko DOSSOU**...  
Cette thèse de doctorat, c'est la récompense de tes œuvres.

A vous tous, frères et sœurs de la famille **AMOUSSOU** à Cotonou et à Dégouè-Akodéha...  
Je vous exprime mes remerciements et ma profonde gratitude pour tout.

A vous **Hémianon Boniface KAKPO**, **Emmanuel ELEGBE**, **Valentin AVODAGBE**,  
**Mathias FAGNIHOUN**, **Lucien AMOUSSOU**, **Abbé Cyriaque AMOUSSOU**...

A vous, mes chères sœurs et amies, **Bertille AVIMADJESSI-LOOSLI** et **Eulalie G. A. ADOLIGBE-AVOCANH** !  
Vous m'avez toujours soutenue depuis mon enfance...  
Sachez que votre compagnie très précieuse m'a donné goût à la science.  
Je viens vers vous partager cette joie car vous la méritez.  
En toute modestie, je vous dis merci et vous rappelle que cette œuvre est aussi la vôtre.

A mes chers enfants, **S.E. Emeric, A.L. Audrey, A.D.F. Dohny...**

*''Il faut étudier...étudier...étudier encore pour l'amour des études...''*

A mon neveu **C. Jonas** et à tous mes neveux et nièces de Cotonou et de Womey, je dis merci.

A vous tous, membres de la famille **FAGLA GOUGBONOU** restés à Womey/Togoudo, je dis merci pour vos soutiens respectifs de tout genre.

A vous, mes amis, **Pierre DOSSOU-YOVO, Françoise d'ALMEIDA, Colombe SAIZONOU, Franc ADIMAGBOLO-AGOSSOU, Moumouni SALAMI, Abou YEKINI, Kiki AKOBODE, Michel NANOUKON, Gautier OLONI** et à tous les amis de Finagnon, je vous dis un grand merci pour vos différentes prières.

A vous, mes amis, **Jean-Christophe, Claire et Valentine ALLIDE** dans Le Pontet (Avignon-Vaucluse), je dis un grand merci pour vos soutiens de tout genre.

A vous les familles amies **TEISSERENC, FLORENTIN, NICOLAS, MICHEL, HAEUSSLEUR, DE PIZZOL, MARTIN, MONTSION, MUNEREL et RIBEYRE** et à tous mes amis français de Nancy, de la Région du Grand-Couronné, de l'Alsace et de Paris, je dis, un grand merci pour vos soutiens de tout genre.

## Remerciements

Le présent travail a été effectué à l'Unité de Recherche Animal et Fonctionnalité des Produits Animaux (URAFPA/ENSAIA/INPL) en collaboration avec l'Institut Charles Sadron (ICS) de Strasbourg et le CEREP à Poitiers.

Mes premiers remerciements vont à vous, Pr. **Luc MEJEAN**, professeur émérite à l'URAFPA/ENSAIA/INPL pour avoir accepté de diriger ma thèse de doctorat et aussi pour vos conseils et vos encouragements qui m'ont beaucoup aidés.

Je tiens à vous remercier particulièrement pour la confiance que vous m'avez toujours témoignée en m'accordant une grande autonomie.

Aux Professeurs **Guido RYCHEN** et **Cyril FEIDT**,

Vous m'avez accueillie dans votre laboratoire à Nancy et malgré vos multiples occupations, vous m'avez aidé à mener à terme ce chef d'œuvre. Je vous dis un grand merci.

Mes remerciements vont également aux Professeurs **Carlos MARQUES**, **André SCHRÖDER** et **Thierry CHARITAT** qui m'ont accueilli à l'ICS et m'ont enseigné pendant toutes ces années de recherche. J'ai beaucoup bénéficié de leurs connaissances scientifiques, de leur savoir-faire et de leur générosité. L'expérience à l'ICS a été très instructive et constructive pour moi ;

Recevez ici l'expression de ma très profonde gratitude.

Je vous remercie très sincèrement, Pr **Jacques DELARUE**, professeur de Nutrition à l'Université de Brest, Président de la Société Française de Nutrition pour avoir accepté d'être mon premier rapporteur.

J'assure, de mes sincères remerciements, le Professeur **Denis LAIRON**, Directeur de Recherches INSERM-Marseille, Président de la FENS (Federation of European Nutrition Science) qui a accepté d'être mon deuxième rapporteur. Recevez ici l'expression de ma profonde gratitude.

J'assure, de mes sincères remerciements, le Professeur **Olivier ZIEGLER**, professeur de nutrition à la Faculté de médecine de Nancy, malgré ses multiples occupations, a accepté d'être membre de Jury. Recevez ici l'expression de ma profonde gratitude.

Pr **Guido RYCHEN**, vous avez accepté de participer au jugement de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements renouvelés.

A vous M. **Yann GUIVARC'H**, HDR, Maître de conférences à l'URAFPA, vous avez été de tous les combats avec moi et vous avez été mon éclaireur tout au long de cette thèse. Je vous dis très humblement merci pour vos différents conseils, vos critiques constructives et votre disponibilité permanente.

A vous, Dr **Evandro DUARTE**, je vous dis merci pour vos précieux conseils qui m'ont beaucoup aidé tout au début de cette thèse.

A M. **Marc BASLER**, je dis mes sincères remerciements fraternels pour votre grande disponibilité et votre gentillesse.

Mes reconnaissances fraternelles et amicales vont aussi à Mesdames **Catherine LARRIERE**, **Léa KOCH**, **Christine GRANDCLAUDON**, **Claire SOLIGOT-HOGNON**, **Marie-Antoinette DZIURLA**, **Katy POIRET** et toutes les équipes de l'URAFPA et de l'ICS dont les salutations et les sourires m'ont apporté beaucoup de joie et m'ont allégé la charge de la solitude.

Quant à mes condisciples **Yuting SUN**, **Agnès FOURNIER**, **Angélique LAZARTIGUES**, **Fayçal OUNNAS**, **Cécile BOUVERET**, **Constantin MARCOPOULOS**, **Georges WEBER**, **Jean WOLF** et tous les thésards de l'URAFPA et de l'ICS à qui je dis, de tout mon cœur un grand merci! Je ne vous oublierai pas.

Mes sincères remerciements vont également au Professeur **Joseph HOUNHOUGAN**, au Docteur **Générose DALODE**, à **Fernande HONFO-ZANNOU** et à tous mes autres collègues et amis de la Faculté des Sciences Agronomiques de l'Université d'Abomey-Calavi qui m'ont soutenu pendant toutes ces longues années de recherche.

## Liste des figures

- Fig. 1 :** Internalisation des HAP dans la bicouche lipidique selon Plant et *al.*, 1995 ; Jimenez et *al.*, (2002)
- Fig. 2 :** Schéma de circulation des POP dans l'environnement
- Fig. 3 :** Structure générale des PCBs
- Fig. 4 :** Structure de dioxines et furanes
- Fig. 5 :** Formation de dioxine de Seveso
- Fig. 6 :** 16 HAP de la liste prioritaire de l'US-EPA
- Fig. 7 :** Structure de base d'une catécholamine
- Fig. 8 :** Structure de la noradrénaline
- Fig. 9 :** Structure de la dopamine
- Fig.10 :** Structure de l'adrénaline
- Fig.11 :** Structure à sept domaines membranaires du récepteur  $\alpha_2C_2$ -adrénergique humain (séquence d'acides amines)
- Fig. 12 :** Schéma des voies enzymatiques mises en jeu dans la lipolyse induite à partir des récepteurs membranaires  $\alpha$  et  $\beta$ -adrénergiques
- Fig. 13 :** Structure de la protéine G
- Fig. 15 :** Structure de la membrane biologique
- Fig. 16 :** Canal ionique
- Fig. 17 :** Structure chimique d'un phospholipide
- Fig. 18 :** Schéma d'un phospholipide
- Fig. 19 :** Dispositif pour réaliser les monocouches de Langmuir
- Fig. 20 :** Monocouche phospholipidique
- Fig. 21 :** Double couche de molécules phospholipidiques
- Fig. 22 :** Liposome formé par les phospholipides
- Fig. 23 :** Lipoprotéine de faible densité (LDL)
- Fig. 24 :** Principe de formation d'une micelle
- Fig. 25 :** Micelle de mayonnaise
- Fig. 26 :** Equipements de l'électroformation et d'observation des vésicules
- Fig. 27 :** Formules semi-développées du pyrène et du fluoranthène
- Fig. 28 :** Vésicules géantes de DOPC (sans HAP)
- Fig. 29 :** Vésicules formées de DOPC (avec HAP)
- Fig. 30 :** Une vésicule fluorescente
- Fig. 31 :** Profil en 3D d'une vésicule fluorescente
- Fig. 32 :** Différents domaines autour de la vésicule
- Fig. 33 :** Etude quantitative de la fluorescence de vésicules contenant une fraction molaire 50% de pyrène et 50% de DOPC
- Fig. 34 :** Etude quantitative de fluorescence de vésicules contenant une fraction molaire 33% de pyrène et 67% de DOPC
- Fig. 35 :** Etude quantitative de fluorescence de vésicules contenant une fraction molaire 33% de fluoranthène et 67% de DOPC
- Fig. 36 :** Etude quantitative de la fluorescence de vésicules contenant une fraction molaire 50% de fluoranthène et 50 % de DOPC
- Fig. 37 :** Vésicules de DOPC plongées dans des solutions aqueuses micromolaires de pyrène
- Fig. 38 :** Vésicules de DOPC plongées dans des solutions aqueuses micromolaires de fluoranthène

- Fig. 39 :** Etude quantitative de la fluorescence de vésicules de DOPC plongées dans une solution aqueuse micromolaire de pyrène
- Fig. 40 :** Etude quantitative de la fluorescence de vésicules de DOPC plongées dans une solution aqueuse micromolaire de fluoranthène
- Fig. 41 :** Quantité de polluants insérée dans la membrane
- Fig. 42 :** Principe de l'étirement d'une micropipette
- Fig. 43 :** L'étireuse de micropipette
- Fig. 44 :** La forge : dimensionnement et polissage de la micropipette
- Fig. 45 :** Dispositif de micropipette
- Fig. 46 :** Schéma d'une vésicule partiellement aspirée dans une micropipette
- Fig. 47a :** Vésicules de DOPC soumises à des tensions différentes
- Fig. 47b :** Schéma de déroulement d'une expérience d'aspiration
- Fig. 48 :** Histogrammes de comparaison des modules de courbure  $k_c$
- Fig. 49 :** Expérience de micropipette : deux courbes typiques d'étirement des vésicules de DOPC sans et avec pyrène
- Fig. 50 :** Vue générale et interne du microcalorimètre Compendium Vol II
- Fig. 51 :** L'extrudeuse
- Fig. 52 :** Le Zêtasizer Nano ZS (Malvern Instruments Co, U.K.)
- Fig. 53 :** Courbe de répartition des tailles des liposomes
- Fig. 54 :** Allure typique des courbes d'ITC
- Fig. 55 :** Résultats obtenus après injection des liposomes dans des différentes solutions de pyrène et de l'eau.

## Liste des tableaux

- Tableau 1 :** Liste des Polluants Organiques Persistants établie dans le cadre du Protocole d'Aarhus et de la Convention de Stockholm
- Tableau 2 :** Sources anthropiques des HAP
- Tableau 3 :** Relation entre l'exposition journalière et les conséquences en terme de santé humaine (INSERM, 2000)
- Tableau 4 :** Conséquences en terme de santé de la présence des HAP et des dioxines chez les hommes (Union Européenne 1999)
- Tableau 5 :** Propriétés physico-chimiques (à 20°C) des 16 HAP listés par l'US EPA (d'après Mackay et *al.*, 1992)
- Tableau 6 :** Concentration des HAP ( $\text{mg.kg}^{-1}$  de sol) dans les sols contaminés (Juhasz et Naidu, 2000)
- Tableau 7 :** Variations de la réponse lipolytique aux catécholamines dans le tissu adipeux humain
- Tableau 8 :** Paramètres de l'équation de Hill obtenus sur un récepteur adrénergique  $\beta$  (CEREP)
- Tableau 9 :** Pourcentage (%) moyen de contrôle de liaison spécifique et (%) d'inhibition de contrôle contraignant réalisé en présence de benzo[a]pyrène (n = 2).
- Tableau 10 :** Test de fonctionnalité du récepteur  $\beta 1$  en présence de benzo[a]pyrène comme antagoniste potentiel
- Tableau 11 :** Conditions de fluorescence optimisée pour la détermination des analytes des HAP

## Liste des abréviations

<b>AFSSA :</b>	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
<b>AC :</b>	Adénylyl cyclase
<b>ACTH :</b>	Hormone adrénocorticotropique
<b>AG :</b>	Acide gras
<b>ALBP :</b>	Adipocyte lipid binding protein ou aP2
<b>ANP :</b>	Peptide natriurétique de type A
<b>AMPC :</b>	Adénosine mono-phosphate cyclique
<b>ATSDR:</b>	The Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR)
<b>B[a]P :</b>	Benzo[a]pyrène
<b>CITEPA:</b>	Centre Interprofessionnel Technique d'Etude de la Pollution Atmosphérique
<b>D<sub>f</sub> :</b>	Coefficient de diffusion
<b>DGAL :</b>	Direction Générale de l'Alimentation
<b>DOPC :</b>	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
<b>DPCC :</b>	Dipalmytoyl- PhosphatidylCholine
<b>HAP :</b>	Hydrocarbure(s) Aromatique(s) Polycyclique(s)
<b>HAPH :</b>	Hydrocarbure(s) Aromatique(s) Polycyclique(s) Halogénés
<b>HCB :</b>	Hexachlorobenzène
<b>HCH :</b>	Hexachlorocyclohexane
<b>IARC :</b>	Centre International de Recherche sur le Cancer
<b>INERIS :</b>	Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques
<b>INSERM :</b>	Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale
<b>Gi :</b>	Protéine G inhibitrice
<b>Gs :</b>	Protéine G stimulante
<b>IRS :</b>	Insulin receptor substrate
<b>IRD :</b>	Institut de Recherche pour le Développement
<b>LHS :</b>	Lipase hormono-sensible
<b>LMG :</b>	Lipase des monoglycérides
<b>OMS :</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>K<sub>ow</sub> :</b>	Coefficient de partage entre l'octanol et l'eau
<b>Pg :</b>	Picogramme (10 <sup>-9</sup> )
<b>PCB :</b>	PolyChloroBiphényles
<b>PCDD :</b>	PolyChloroDibenzoDioxine
<b>PCDF :</b>	PolyChloroDibenzoFurane
<b>P.E.N.U. :</b>	Programme d'Environnement des Nations Unies
<b>PDE-3B :</b>	Phosphodiesterase 3B
<b>PI3-K :</b>	Phosphatidylinositol-3-phosphate kinase
<b>POPs :</b>	Polluants Organiques Persistants
<b>PKA :</b>	Protéine kinase A
<b>PKB :</b>	Protéine kinase B
<b>RA :</b>	Récepteur adrénergique
<b>TCI :</b>	Titration calorimétrique isotherme
<b>TCDD/F :</b>	2,3,7,8-tétrachlorodibenzo(para)dioxine/furane
<b>TEF :</b>	Facteur d'équivalence toxique
<b>TEQ :</b>	Quantité d'équivalence toxique
<b>US-EPA :</b>	Agence américaine de l'environnement

## Glossaire

**Adduit** : Fixation d'une molécule sur une des bases de l'ADN par une liaison covalente pouvant parfois former un pont intra-caténaire entre les chaînes de l'ADN

**Cytosol** : liquide contenu à l'intérieur des cellules

**Facteur de transcription** : Protéine permettant la lecture d'un gène lorsqu'elle se fixe sur son promoteur

**Radical libre** : Espèce chimique possédant un électron non apparié

**Sites abasiques** : Partie de l'ADN dépourvue d'une base purique ou pyrimidique et ayant perdu l'information génétique par rupture de la liaison entre une base et le désoxyribose

**Xénobiotique** : Molécule étrangère, susceptible de pénétrer dans le corps humain

**Stress oxydant** : Situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques, situation que les chercheurs impliquent dans la plupart des maladies humaines

**TNF- $\alpha$**  : Facteur de Nécrose Tumorale  $\alpha$  : globule blanc spécialisé dans la production de protéines qui détruisent les cellules cancéreuses de manière sélective ; il s'agit d'une forme de thérapie biologique

## Introduction

L'obésité est caractérisée par l'accumulation de triglycérides dans le tissu adipeux : ses conséquences pour la santé sont néfastes. En effet, de multiples complications surviennent fréquemment chez l'obèse :

- des désordres concernant les métabolismes des lipides et des glucides, peuvent être associés à l'accumulation de tissu adipeux, au point de parler de la triade des maladies métaboliques : diabète, obésité, hyperlipoprotéïnémie
- la survenue de ces maladies augmente le risque de mortalité globale, car elles sont facteurs de risques d'atteintes cardiovasculaires voire de cancers, deux causes principales de la mortalité depuis le milieu du vingtième siècle (Garrigue et *al*, 2005).

Envisagée sur un plan thermodynamique, l'obésité résulte d'un déséquilibre de la balance énergétique, avec une augmentation des apports, en raison d'un déséquilibre nutritionnel quantitatif et qualitatif, et une réduction des dépenses, en raison d'une augmentation des attitudes sédentaires et d'une diminution de la pratique d'activité physique (Garrigue et *al*, 2005).

L'obésité est un "état caractérisé par un excès de masse adipeuse répartie de façon généralisée dans les diverses zones grasses de l'organisme". Le plus souvent, l'obésité est appréciée par le rapport entre le poids (exprimé en kg) et le carré de la taille (en m<sup>2</sup>) (IMC ou BMI en anglais) Un IMC supérieur à 30 est généralement considéré comme le marqueur de l'obésité qui devient morbide quand cet index est supérieur à 40.

Mais il faut noter qu'il n'y a pas de stricte équivalence entre poids et obésité puisque dans le poids interviennent, outre la masse grasse, le tissu osseux, le contenu aqueux et le muscle. Du point de vue structurel, l'obésité est caractérisée par une hypertrophie et une hyperplasie des adipocytes sans que la recherche ait pu identifier des formes favorisant l'une ou l'autre atteinte du tissu adipeux.

On a très longtemps considéré que l'obésité affectait préférentiellement des populations de la zone « Nord » c'est-à-dire les pays économiquement développés : on sait aujourd'hui qu'il n'en est rien. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) :

- Sur 6 milliards d'individus, 3 milliards sont sous-alimentés et les autres sont en train de devenir obèses.
- 50 % des américains sont en surpoids et 25 % franchement obèses.
- Dans certaines îles du Pacifique, l'obésité affecte près de deux tiers de la population.
- L'Europe compte 30% d'adultes en surpoids et le nombre d'enfants obèses a doublé en cinq ans dans les dix dernières années. En Allemagne, en Grèce, en Finlande, à Chypre, à Malte, en Slovaquie, la proportion d'adultes en surpoids va dépasser celle des USA.
- On dénombre en France 8 millions d'obèses, de 100 000 à 200 000 obésités massives (IMC > 40). Un tiers de ces patients sont hypertendus, un tiers diabétique et un tiers hyperlipidémique.
- Sur le plan national, la prévalence de l'obésité a augmenté d'environ 45 % entre 1987 et 1996.
- D'un point de vue régional, il y a une répartition très inégale de ce phénomène sur le territoire français : les campagnes sont plus affectées que les villes, le pourtour méditerranéen subit une évolution particulièrement rapide et défavorable...La Corse est la région où il y a la plus forte prévalence de France avec un maximum de 24 % d'obèses.
- Une progression inquiétante car elle porte sur des individus de plus en plus jeunes.

Les pays les plus pauvres de la planète souffrent désormais également de l'obésité. Selon l'OMS sur les 300 millions de personnes obèses dans le monde, 115 millions le sont dans les pays en développement. Citons quelques données relevées dans les plus récentes statistiques : En Tunisie le taux d'obésité est passé de 28 à 42 % en 10 ans, au Brésil de 22 à 34%.

En Afrique subaharienne où vivent la plupart des populations sous-alimentées ce taux est de 12%, en Egypte de 33%.

Selon l'OMS, l'Algérie compterait 18 % d'obèses et le Maroc 16 %. Des chiffres en progression constante.

En général, l'obésité représenterait entre 2 et 7 % des coûts totaux de santé. Elle coûte 100 à 120 milliards de dollars aux USA (sans tenir compte du surpoids) et engendre selon Bernard Maire, chercheur à l'IRD et *al*, (2006) des conséquences sur la santé de la population planétaire :

- Les obèses ont dix fois plus de risque de devenir diabétiques.

- Il y a dans le monde 150 millions de diabétiques de type 2 (diabète lié à une alimentation trop riche et au manque d'exercice). Ce chiffre serait appelé à doubler...
- En France, il y a 2 millions de cas et entre 300 000 et 800 000 diabétiques qui s'ignorent.
- Les adultes en surpoids sont 3 fois plus nombreux que les autres à souffrir d'hypertension artérielle.
- Les calculs biliaires sont 3 à 4 fois plus fréquents en cas d'obésité.
- L'apnée du sommeil est présente chez plus de 10 % des hommes et femmes obèses...

L'obésité est devenue la première maladie non infectieuse de l'Histoire. C'est une véritable épidémie qui frappe aussi bien les pays industrialisés que les pays en voie de développement. L'Organisation Mondiale de la Santé place actuellement sa prévention et sa prise en charge comme une priorité dans le domaine de la pathologie nutritionnelle (A. Meille-Jordan).

## LA RECHERCHE DES CAUSES

Plusieurs facteurs sont évoqués pour expliquer l'augmentation de la fréquence de cette pathologie : facteurs génétiques, facteurs endocriniens, facteurs environnementaux et modifications comportementales. Mais l'origine nutritionnelle est le plus souvent citée :

- *la « malbouffe »* avec une alimentation trop riche (nourriture à haute teneur en graisses).  
Les populations occidentales ont tendance à consommer moins de calories et moins de graisses qu'en 1960 alors qu'elles grossissent régulièrement. Cela s'explique par un changement du style de vie qui devient de plus en plus sédentaire.
- *manque d'activité physique* : il existe un réel déséquilibre entre l'alimentation ingérée et les dépenses énergétiques.

Au niveau des populations des pays défavorisés ou en émergence, du fait de l'urbanisation accélérée, qui a bousculé les modes d'alimentation, le contenu de l'assiette du Maghrébin a profondément changé. On est passé de plats traditionnels composés d'huiles, de céréales, de légumineuses et de légumes frais à une consommation plus fréquente de pain blanc, de produits laitiers, de sucres et de graisses ajoutées.

Une étude montre que dans 133 pays en développement la migration dans les villes a entraîné jusqu'à un doublement de la consommation de plats gras et sucrés, peu chers.

Selon les auteurs de l'article "cahiers santé" l'accès facile à des huiles peu onéreuses a joué un rôle prépondérant en raison d'une production industrielle à bas prix. Cela s'ajoute à la diminution de l'activité physique et la sédentarité (Jeune Afrique, Août 2010).

**Ainsi, le statut nutritionnel expliquerait cette évolution de la fréquence de l'obésité** : les travaux d'Arnaud Basdevant (2009) ont montré que le problème nutritionnel est l'une des causes de l'obésité dans les pays développés, par suite du suivi de comportement alimentaire à risques : augmentation de l'hyperconsommation et de l'hyperlipidémie de la ration associée à une baisse de l'activité physique ; Bernard Maire et *al.*, (2006), ont proposé que l'obésité dans le Tiers-monde soit un problème lié par ailleurs à la mutation nutritionnelle.

**Au-delà des problèmes de comportement ou de mutation nutritionnelle ne faudrait-il pas chercher d'autres causes?**

**L'obésité serait-elle la conséquence de la pollution atmosphérique et de l'imprégnation des populations à une exposition chronique à des polluants ?** L'hypothèse n'est pas nouvelle dans la mesure où, en 1983, Huchéon et coll avait mis en évidence un lien statistique entre obésité et exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques dans des échantillons de population spécifiquement étudiés.

C'est cette hypothèse sur laquelle le laboratoire de rattachement a travaillé.

# **Partie 1**

## **Chapitre 1 :**

### **Les polluants organiques persistants (POP)**

Avant d'avancer plus dans la réflexion de cette thèse il convient de rappeler ici ce que sont les concepts de pollution et de polluants présents dans l'environnement et susceptibles d'interférer avec l'état physio-pathologique de l'individu.

#### **A. Propriétés et effets des POP**

Les POP sont des molécules contaminantes. Ils sont définis par le protocole d'Aarhus depuis 1998 (Commission Economique des Nations Unies) (Tableau 1).

- Ils sont persistants.
- Ils sont susceptibles de bioaccumulation.
- Ils peuvent aisément être transportés dans l'atmosphère au-delà des frontières sur de longues distances et se déposer sur des sites éloignés des sources d'émission.
- Ils risquent d'avoir des effets nocifs importants sur la santé et l'environnement, même à une grande distance de leur source.
- Ils possèdent des caractéristiques toxiques.

Les Polluants Organiques Persistants (POP) sont produits par la combustion incomplète de la matière organique. Les sources naturelles sont les feux de forêt, les éruptions volcaniques. Ils sont aussi produits par les procédés industriels. Les dioxines proviennent principalement des fumées des incinérateurs de déchets solides et hospitaliers : 56% des émissions des PolyChloroDibenzoDioxine/Furane (PCDD/F) en France en 2002. La part restante des émissions est produite par les fonderies, les engins agricoles et le recouvrement des routes par l'asphalte. Le total des émissions en France représente 250 tonnes par an (Citepa 2004).

#### **B. Evaluation de la toxicité ; son expression**

##### **1. Le facteur d'équivalence toxique (TEF)**

Les facteurs d'équivalence de toxicité (TEF) sont les composantes d'un indice global de toxicité. Les TEF se fondent sur les similarités structurales entre les molécules et sur l'hypothèse d'un mécanisme d'action commun impliquant le récepteur Aryl Hydrocarbon

(Ah). Cependant, il subsiste de nombreuses incertitudes. Des différences de réponses entre les espèces et les tissus peuvent faire varier significativement les valeurs de TEF (Vidy et *al.*, 2003). Le TEF est créé en comparant la courbe qui représente la relation dose-effet d'un congénère à celle de la molécule de référence de la famille. Cette molécule est considérée comme la plus toxique, et son TEF correspondant est égal à 1.

## **2. La quantité d'équivalence toxique (TEQ)**

La quantité d'équivalence toxique (TEQ), est un outil simplificateur de l'évaluation du risque lié aux mélanges complexes d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et d'hydrocarbures aromatiques polycycliques halogénés (HAPH) (Vidy et *al.*, 2003). Cet indicateur permet de mesurer la toxicité d'un mélange de composés (Van der Berg et *al.*, 1998). Pour le calculer, la concentration d'une molécule dans la matrice étudiée est multipliée par le TEF correspondant ; la même opération est répétée pour toutes les molécules du mélange et l'addition de tous ces résultats sera le TEQ.

$$\text{TEQ} = [\Sigma(\text{benzo[a]pyrène}) \times \text{TEFi}] + \Sigma [\text{pyrène}] \times \text{TEFi} \text{ (DGAL, 1998)}$$

## **3. Coefficient de partage**

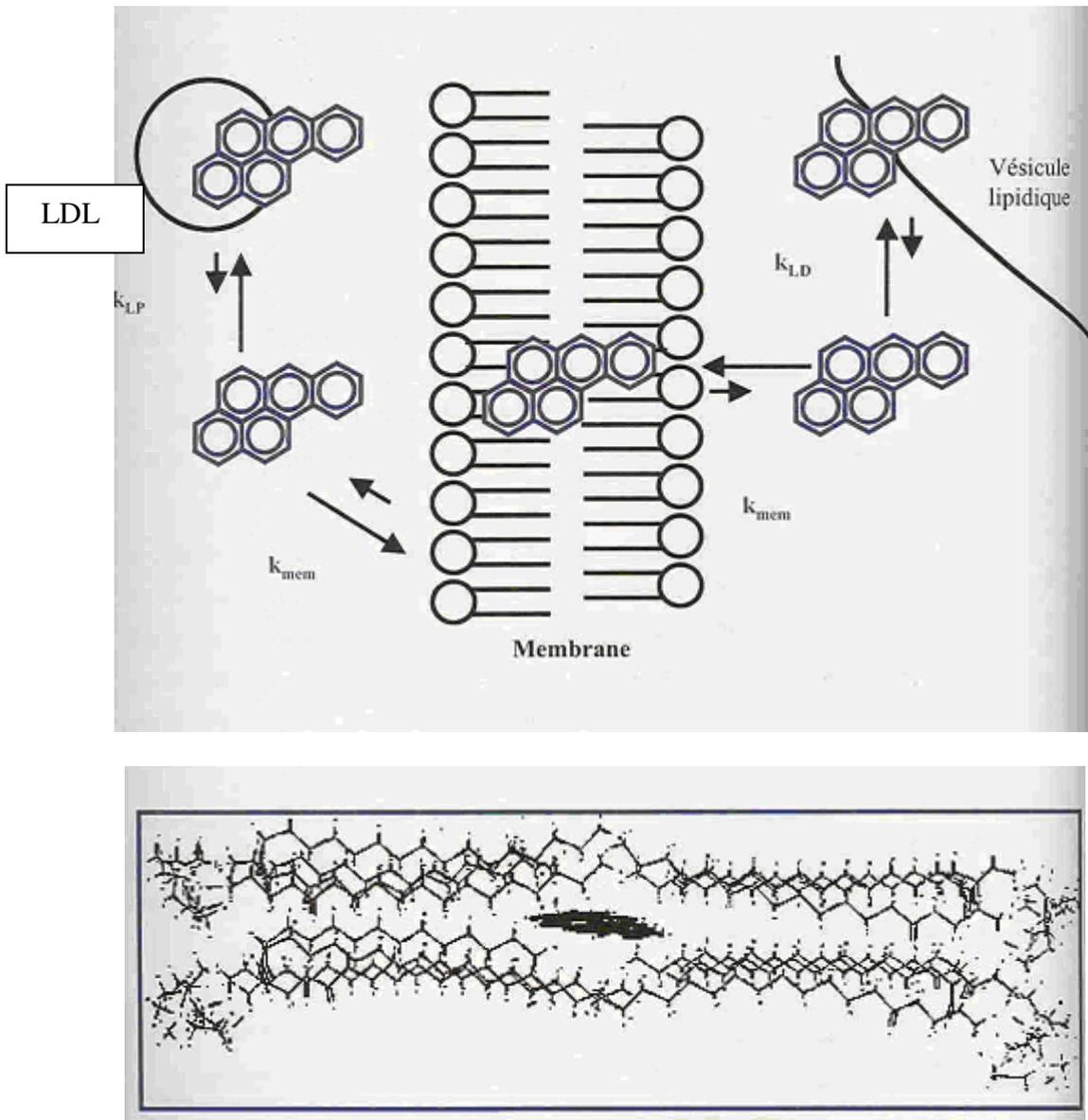
L'hydrophobie ou le caractère lipophile d'une molécule organique est quantifié au moyen de son coefficient de partage entre l'octanol et l'eau ( $K_{ow}$ ), rapport des concentrations du composé à saturation dans le n-octanol et dans l'eau. Il décrit l'affinité de la molécule à se répartir dans une phase lipophile. L'affinité de ces molécules pour la phase organique est nettement supérieure à celle de l'eau. La valeur de  $\text{Log } K_{ow}$  varie de 3,4 pour le naphthalène (2 cycles aromatiques) à 6,75 pour le dibenzo[a,h]anthracène (6 cycles aromatiques) et indique un potentiel de bioaccumulation important dans les tissus gras des organismes où le métabolisme est lent (Grova, 2003).

**Tableau 1** : Liste des Polluants Organiques Persistants établie dans le cadre du Protocole d'Aarhus et de la Convention de Stockholm.

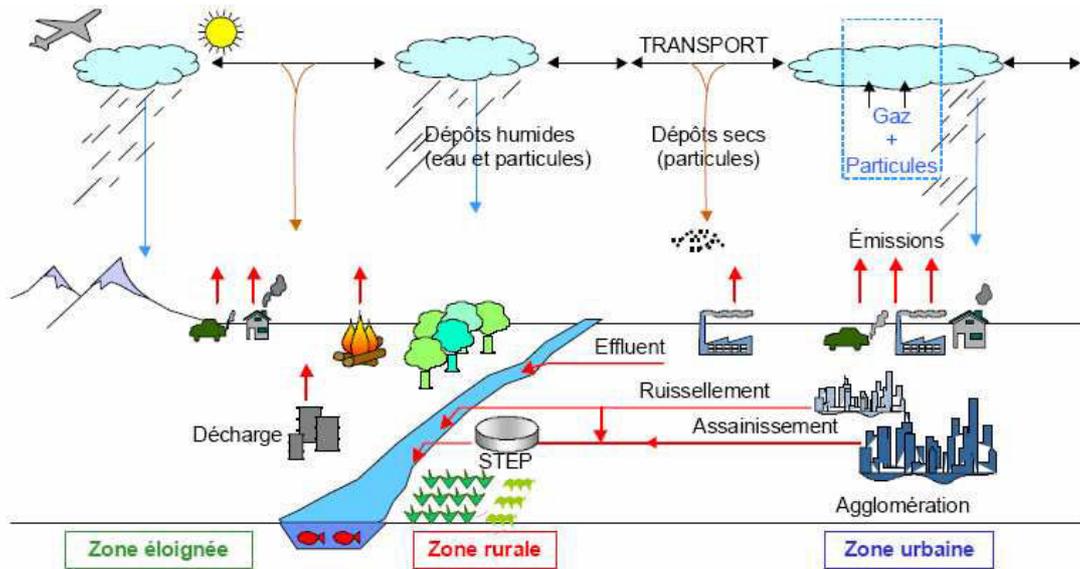
Catégorie	Nom	Particularité
Production non-intentionnelle (sous-produit de réaction)	Dioxines	Sous-produit de combustion ou d'autres procédés industriels
	Furanes	
	Hydrocarbures aromatiques Polycycliques (HAP)	
	Hexabromobiphényles	
Produits chimiques industriels	Polychlorobiphényles (PCBs)	Utilisés comme isolant électrique, fluide caloporteur, additif dans les peintures et plastiques
	Hexachlorocyclohexane (HCH)	Produit intermédiaire de l'industrie chimique
	Hexachlorobenzène (HCB)	Utilisé dans la fabrication de munitions et de caoutchouc
Pesticides	Hexachlorobenzène (HCB)	Fongicide
	Endrine	
	Aldrine	
	Dieldrine	
	Toxaphène	
	Mirex	Insecticides
	Chlordane	
	Heptachlore	
	DDT	
Lindane		

**Tableau 2** : Sources anthropiques de HAP

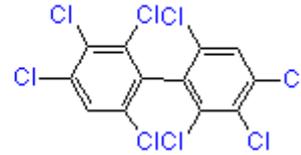
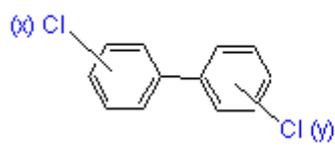
Sources stationnaires industrielles	Sources domestiques	Sources mobiles
-Production d'aluminium	-Chauffage (gaz naturel, GPL, bois, charbon)	-Voitures
-Fabrication de pneu	-Tabagisme	-Avions
-Créosotes et préservation du bois	-Cuisson des aliments (barbecue, friture)	-Trains
-Sidérurgie		-Bateaux
-Industrie du bitume et goudrons		
-Cimenteries		
-Moteurs à combustion		
-Industries pétrochimiques et similaires		



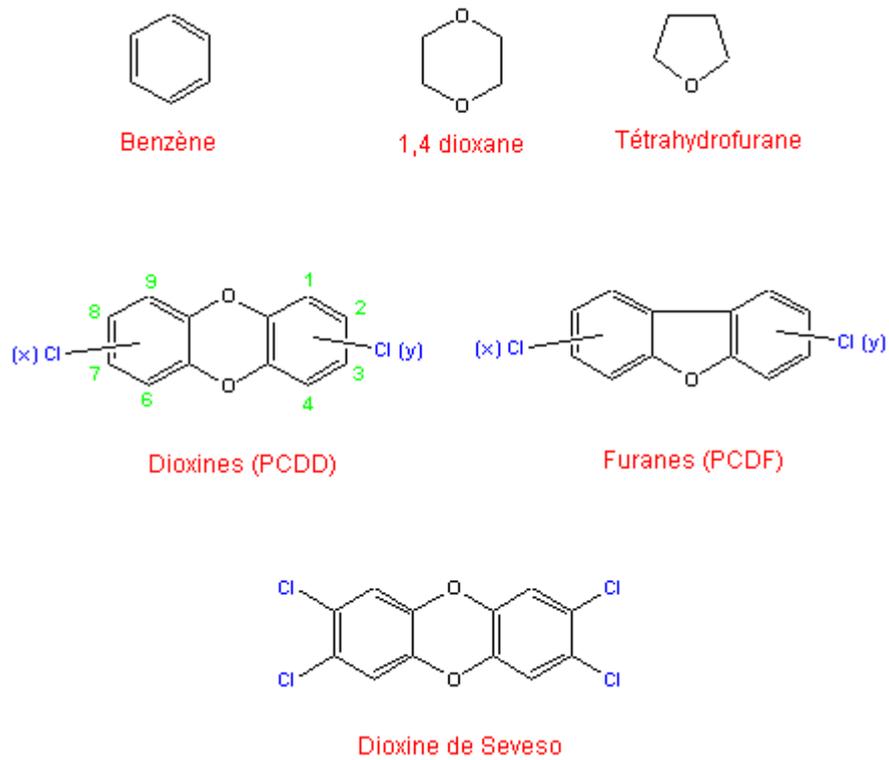
**Figure 1:** Internalisation des HAP dans la bicouche lipidique selon Plant et *al.*, 1995 ; Jimenez et *al.*, 2002.



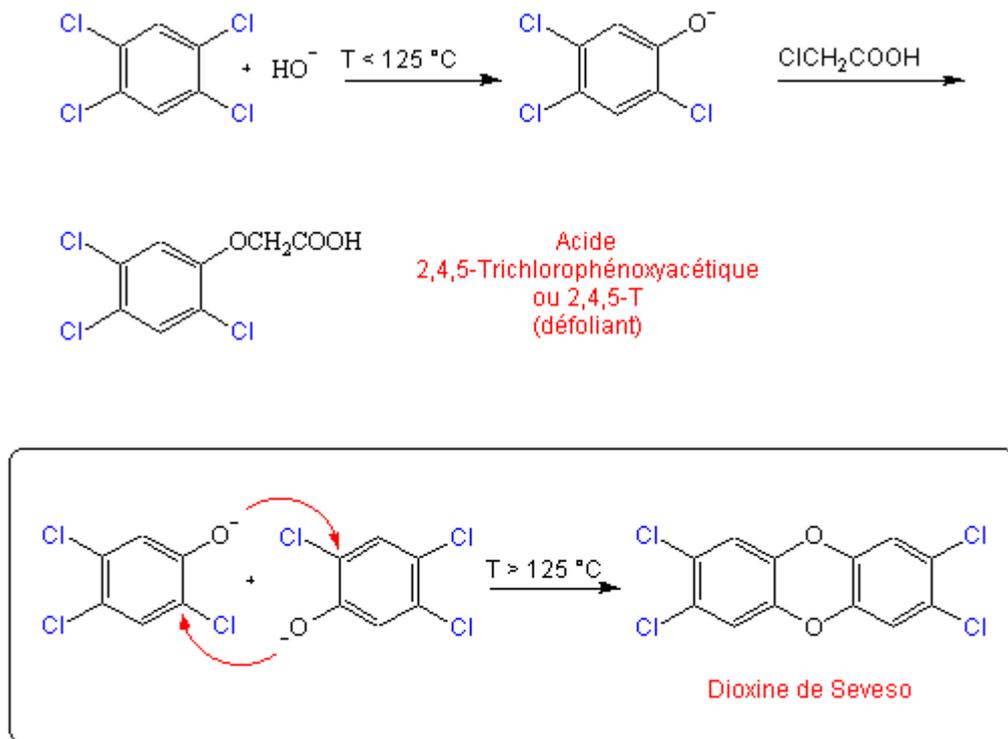
**Figure 2** - Schéma de circulation des POP dans l'environnement



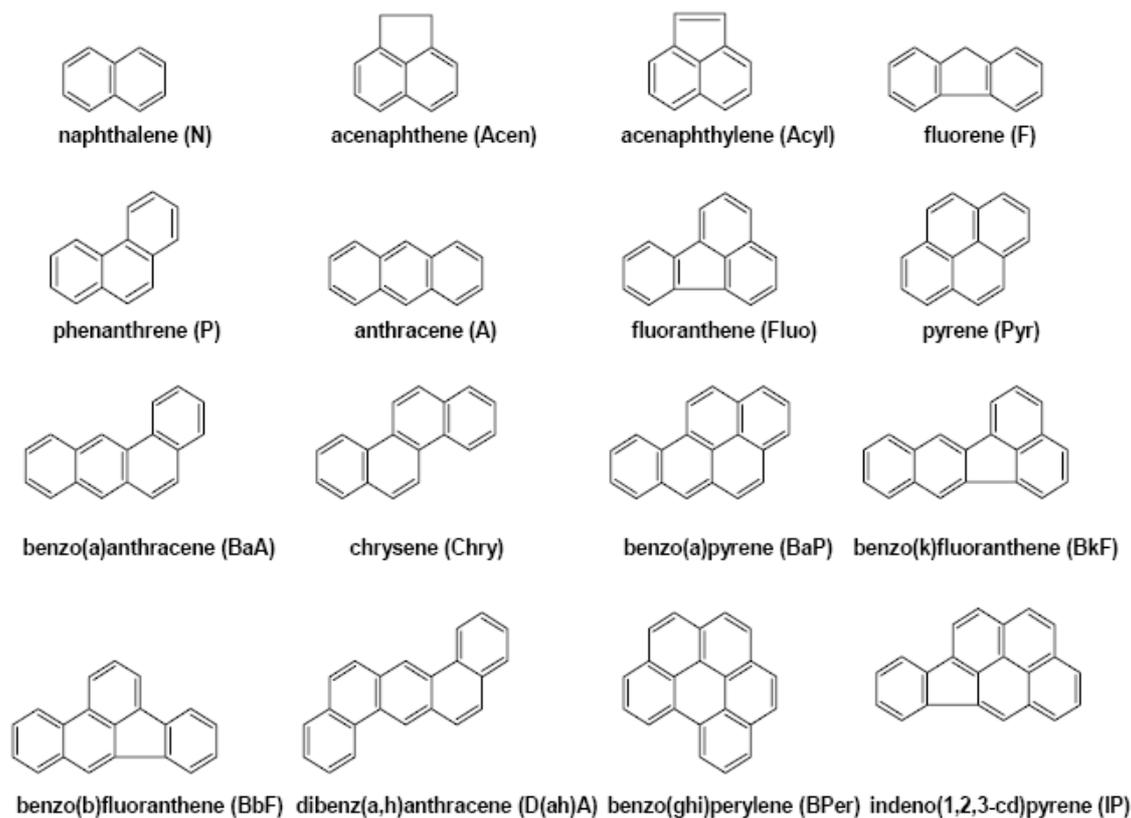
**Figure 3** : Structure générale des PCBs



**Figure 4 :** Structure de dioxines et furanes



**Figure 5 :** Formation de dioxine de Seveso



**Figure 6** : 16 HAP de la liste prioritaire de l'US-EPA

**Tableau 3** : Relation entre l'exposition journalière (exprimée en pg I-TEQ/kg de poids corporel) et les conséquences en terme de santé humaine (INSERM, 2000)

Exposition journalière	Conséquences en terme de santé
Inférieure à 1	Aucune conséquence
Entre 1 et 10 (à long terme)	Risque d'altération de la santé
Supérieur à 10 (à long terme)	Conséquences néfastes

**Tableau 4** : Conséquences en terme de santé de la présence des HAP et des dioxines chez les hommes (Union Européenne, 1999)

<b>HAP</b>	<b>Dioxines</b>
Sévères perturbations du métabolisme de la vitamine A	Formation et développement de cancers supposés lors de la présence de la 2,3,7,8-TCDD
Altération de la concentration en dopamine au niveau neurologique	Augmentation de la fréquence des diabètes et de la mortalité due à ces maladies
Retard cognitif et du développement moteur chez les enfants	Augmentation des maladies cardio-vasculaires
Modification du système immunitaire	Augmentation de la fatigue due à des insomnies
Diminutions du poids des nouveaux-nés, du taux de croissance et du niveau d'activité des enfants	Douleurs musculaires
Perte de mémoire chez les enfants	Irritabilité
Augmentation des cancers avec l'âge des individus	Pertes de la libido
	Changement des perceptions sensorielles
	Augmentation de la fragilité et de la taille du foie
	Diminution de la vitesse de conduction nerveuse
	Diminution de la teneur en lipides du sérum sanguin

## C. Les polychlorobiphényles ou PCB

### 1. Structures et caractéristiques

Le terme de PCB désigne une famille de composés organochlorés de synthèse de haut poids moléculaire et de formule chimique  $C_{10}H_{(10-n)}Cl_n$ . Produits industriellement depuis 1930, ces mélanges ont fait l'objet de multiples utilisations comme additifs dans les peintures, les encres et les apprêts destinés aux revêtements muraux, puis ont été progressivement interdits. Le groupe des PCB comprend 209 congénères, qui se distinguent par le nombre d'atomes de chlore fixés sur la molécule et par leur position sur le noyau biphényle. Le devenir des PCB

dans l'environnement s'explique par leurs propriétés physico-chimiques : ce sont des composés semi-volatils, hydrophobes et persistants. Leur production est arrêtée depuis les années 80. Les pyralènes, sont des mélanges de molécules formées de deux cycles aromatiques (biphényle) pouvant porter chacun un nombre variable d'atomes de chlore placés en diverses positions de chlore présents sur la molécule.

## **2. Effets sur la santé**

La toxicité aiguë des PCB est faible pour l'homme : une exposition accidentelle de courte durée aux PCB n'a pas de conséquence grave. Une exposition aiguë à forte dose est associée à des irritations de la peau (chloracné) et plus rarement des infections hépatiques, neurologiques, des bronchites chroniques, des maux de tête, des vertiges, des dépressions, des troubles de la mémoire et du sommeil, de la nervosité et de la fatigue, et de l'impuissance (environnement Canada, 1985). Ces troubles sont, pour certains, réversibles. Les effets chroniques entraînent des dommages du foie, des effets sur la reproduction et la croissance, et des possibilités de cancer. Les PCB sont classés en tant que substances probablement cancérogènes pour l'homme et ont toute une série d'effets néfastes chez l'animal, notamment toxicité pour la reproduction, immunotoxicité et cancérogénicité. Les effets sur les hormones thyroïdiennes et les conséquences possibles sur le développement du cerveau sont l'objet de discussions à l'heure actuelle. En outre, à partir de 500°C et en présence d'oxygène, la décomposition des PCB peut se traduire par le dégagement de composés à forte toxicité, les « furanes » et « dioxines ».

## **3. Voie d'absorption des PCB**

L'absorption des PCB dépend de la voie d'exposition. La principale source d'exposition professionnelle est l'inhalation (Wolff, 1985). Il existe des preuves indirectes de l'absorption des PCB par cette voie, basées sur leur détection dans les tissus et liquides biologiques de salariés travaillant dans des usines de fabrication de condensateurs, où les concentrations dans l'air ont été mesurées. Un maximum de 80 % des quantités détectées dans le tissu adipeux a pu être absorbé par inhalation et seulement 20 % par voie orale ou cutanée.

Pour la population générale, la voie principale d'exposition est la nourriture contaminée (poisson, lait, produits laitiers, légumes, viandes) (ATSDR, 2000). Duarte-Davidson et Jones (1994) estiment que la population anglaise est exposée à 0,53 µg de PCB par personne et par jour. La nourriture représenterait 97 % de cet apport, l'air 3,4 % et l'eau 0,04 %. Chez

l'enfant, le taux d'absorption des PCB se produit par le lait maternel. Chez un enfant de 19 semaines, l'absorption de 4 congénères (PCB 99-153-138-180) présents dans le lait maternel a été estimée entre 96 et 98 % de l'absorption totale (McLachlan, 1993).

#### **4. Métabolisme des PCB**

Le métabolisme des PCB se réalise au niveau du foie, par l'intermédiaire des cytochromes P-450 (1A1, 1A2, 2B1, 2B2, 3A). Il conduit à la formation d'oxydes d'arènes qui sont ensuite principalement transformés en composés aromatiques hydroxylés (phénoliques majoritairement), mais aussi en métabolites soufrés. Les oxydes d'arène peuvent également produire des dihydrodiols ou des conjugués au glutathion, ou encore réagir avec des macromolécules endogènes tels que les acides nucléiques ou les protéines et former des adduits. Les oxydes d'arènes sont potentiellement électrophiles et ont été impliqués dans la survenue de nécrose cellulaire, de mutagénicité et de cancérogénicité chez les animaux (Safe, 1989). Le métabolisme des PCB peut donner naissance à des quinones capables de réagir sur les sites nucléophiles des protéines (Amaro *et al.*, 1996) ou de l'ADN (Oakley *et al.*, 1996b). Les PCB peu chlorés sont activés métaboliquement en espèces électrophiles qui se lient à l'ADN (McLean *et al.*, 1996 ; Oakley *et al.*, 1996a). Le métabolisme peut aussi conduire à la formation de PCB méthyl sulfones qui peuvent être responsables de toxicité respiratoire (ATSDR, 2000). Les métabolites méthyl-sulfonylés ont fait l'objet d'une attention particulière en raison de leur caractère lipophile et par conséquent de leur capacité à stagner dans les tissus, mais aussi pour leur capacité d'induction du cytochrome 2B. D'une façon générale, plus le degré de chloration des PCB augmente, plus le taux de métabolisation diminue.

L'élimination des PCB et de leurs métabolites se fait principalement par les fèces. La médiane de la demi-vie apparente comparée en fonction du degré de chloration a été déterminée à 2,6 et 4,8 ans respectivement (Phillips *et al.*, 1989). Le lait maternel constitue une voie particulière d'élimination (Baars *et al.*, 2001).

Dans le rapport présenté à Stockholm, on pouvait lire : « Quantités de personnes ont été exposées aux PCB du fait de la contamination des aliments. La consommation d'huile de riz contaminée au Japon en 1968, et à Taiwan en 1979, a entraîné plusieurs symptomatologies : pigmentation des ongles et des membranes muqueuses, gonflement des paupières, fatigue, nausées, vomissements. Du fait de la persistance des PCB dans le corps de leurs mères, les enfants nés jusqu'à 7 ans après l'accident de Taïwan ont présenté des retards de croissance et des problèmes de comportement. De même, les enfants nés de mères qui mangeaient une

grande quantité de poissons contaminés du Lac Michigan ont présenté une déficience mnésique à court terme ». Les PCB sont également immunodépresseurs et sont classifiés parmi les agents probablement cancérogènes pour l'homme.

## **D. Les polychlorodibenzo-para-dioxines (PCDD) ; les polychlorodibenzo-furanes (PCDF)**

### **1. Structure et caractéristiques**

Les polychlorodibenzo-p-dioxines ou PCDD sont des composés aromatiques tricycliques chlorés. Elles sont plus généralement appelées dioxines, bien que sous cette appellation sont aussi le plus souvent incluses d'autres molécules aux propriétés chimiques voisines. On estime qu'elles présentent une faible toxicité en général pour l'homme, à l'exception de sept d'entre elles, dont la tétrachlorodibenzo-para-dioxine (TCDD), surnommée dioxine de Seveso. Les PCDD sont constituées de deux noyaux de benzène, de deux atomes d'oxygène et d'atomes de chlore, de fluor ou de brome (1 à 8). On en distingue 75 différentes, qui diffèrent les unes des autres par le nombre et la position des atomes de chlore, ainsi que par la disposition des cycles aromatiques.

Elles se caractérisent par leur grande stabilité chimique due à la présence des atomes de chlore, et elle augmente donc avec le nombre d'atomes de chlore présents. Elles sont résistantes à la biodégradation, et seuls des oxydants tels que l'ozone, le tétroxyde de ruthénium ou des enzymes d'oxydation peuvent réagir avec elles.

Les furanes ou PCDF et pyralènes ou PCB, ont une composition et des propriétés voisines des PCDD. En dehors des accidents et des pollutions dus aux "incinérateurs-empoisonneurs", la principale source d'exposition aux PCDD/PCDF est l'alimentation. En effet, comme tous les hydrocarbures aromatiques polycycliques halogénés (HAPH), les PCDD et PCDF ont en particulier une forte capacité à s'accumuler le long des chaînes alimentaires et, selon le rapport de l'INSERM : "Globalement, il est admis que l'exposition moyenne des populations se fait à plus de 95 % par voie alimentaire, en particulier par ingestion de graisses animales (lait et produits laitiers, viandes, poissons). L'apport le plus important est dû aux produits d'origine bovine (lait et dérivés, viande et abats) ; les volailles et le porc constituent des sources moindres, en raison de leur mode d'élevage en bâtiments (sauf en cas de contaminations des aliments). Les poissons et produits aquatiques représentent des sources d'importance variable, parfois relativement élevée pour certaines populations de forts consommateurs."

Les PCDD et les PCDF sont des molécules formées de deux cycles aromatiques associés à un cycle oxygéné soit de type *1,4 dioxane* pour les PCDD, soit de type *furane* pour les PCDF.

Deux voies réactionnelles peuvent conduire à la formation de dioxines et/ou de furanes :

- Le chauffage en présence d'oxygène, au-delà de 300°C de certains précurseurs de type halogénés HAPH (PCBs, polychlorophénols) qui conduisent alors principalement à la formation de furanes.
- Le chauffage de molécules organiques quelconques en présence d'une "source de chlore" et d'oxygène moléculaire.

Cette dernière voie montre que les PCDD et/ou les PCDF peuvent donc être théoriquement générés par chauffage, à partir de n'importe quel composé chloré, y compris le plus inoffensif, jouant le rôle de "source de chlore".

Pour les dioxines, les concentrations peuvent atteindre quelques ng/m<sup>3</sup> lors d'un mauvais contrôle de rejet dans l'atmosphère (Grochowalski et *al.*, 1995)

## 2. Effets sur la santé

Les dioxines et les furanes présentent des toxicités très variables, en fonction du nombre et du positionnement des atomes de chlore. Parmi les 210 composés existant théoriquement, les 17 congénères substitués en position 2, 3, 7 et 8 sont les plus toxiques et sont particulièrement bio-accumulables. La dioxine la plus toxique est la dioxine de Seveso.

L'OMS et le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF) ont tous deux considérés que la dioxine jouait un rôle promoteur de la cancérogenèse, avec un seuil en deçà duquel l'exposition est sans danger. L'OMS définit ainsi la dose journalière tolérable (DJT) pour l'homme à 10 pg TEQ\*/kg de poids corporel/jour ; cela inclut un facteur de sécurité de 10000 par rapport à la dose minimum à effet observé chez le rat. Le CSHPF rajoute cependant un facteur de sécurité de 10 et fixe la dose journalière tolérable (DJT) à 1 pg/kg/j, comme en Allemagne et aux Pays-Bas.

Dans le doute, l'US-EPA (Agence des Etats Unis pour la protection de l'environnement), a choisi le modèle de la fonction dose-réponse linéaire sans seuil à faible dose. Pour ne pas encourir un excès de risque supérieur à 10<sup>-6</sup> pour une vie entière (70 ans), l'exposition journalière moyenne ne doit pas dépasser 6 pg/kg/j. De plus, l'affinité stéréospécifique du récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR) vis à vis des micropolluants permettrait de comprendre les différences de toxicité entre ces congénères (Laurent C., 2002). On peut provisoirement retenir 2,3 pg/kg/j (en TEQ) comme valeur médiane de l'apport journalier de

dioxine, par la voie alimentaire en France (voie qui totaliserait 90 à 95% des apports totaux). Une telle exposition de la population générale n'entraînerait aucun excès de risque de cancer selon le raisonnement de l'OMS, avec une sérieuse marge de sécurité. Le modèle de l'US-EPA appliqué à 2,3 pg/kg/j produit une estimation d'impact assez importante, de l'ordre de 3200 à 5200 décès annuels par cancer (Tableaux 3 et 4).

**Tableau 5** : Propriétés physico-chimiques (à 20°C) des 16 HAP listés par l'US EPA (d'après Mackay et *al.*, 1992)

Composé	Nombre de cycles	Masse moléculaire (g/mol)	Solubilité dans l'eau (mg/L)	Coefficient de partage octanol-eau $\log(K_{ow})$	Pression de vapeur (Pa)
Naphtalène	2	128,2	31	3,4	10
Acénaphtylène	3	152,2	3,93	4,07	$2,9 \cdot 10^{-2}$
Acénaphène	3	154,2	1,93	3,98	$4,47 \cdot 10^{-3}$
Fluorène	3	166,2	1,85	4,18	$3,2 \cdot 10^{-4}$
Phénanthrène	3	178,2	1,2	4,45	$6,8 \cdot 10^{-4}$
Anthracène	3	178,2	0,076	4,45	$1,7 \cdot 10^{-5}$
Fluoranthène	4	202,3	0,23	4,90	$5,0 \cdot 10^{-6}$
Pyrène	4	202,3	0,077	4,88	$2,5 \cdot 10^{-6}$
Benzo(a)anthracène	4	228,3	0,010	5,61	$2,2 \cdot 10^{-8}$
Chrysène	4	228,3	0,0028	5,16	$6,3 \cdot 10^{-7}$
Benzo(b)fluoranthène	5	252,3	0,0012	6,04	$5,0 \cdot 10^{-7}$
Benzo(k)fluoranthène	5	252,3	0,00076	6,06	$9,59 \cdot 10^{-11}$
Benzo(a)pyrène	5	252,3	0,0023	6,06	$7 \cdot 10^{-7}$
Dibenzo(a,h) anthracène	5	278,4	0,0005	6,84	$1 \cdot 10^{-10}$
Indéno(1,2,3-c,d)pyrène	6	276,3	0,062	6,58	n.d.
Benzo(g,h,i)pérylène	6	276,3	0,00026	6,50	$1,03 \cdot 10^{-10}$

n.d. : non déterminé

## **E. Origine des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)**

Les HAP, polluants organiques persistants, sont constitués d'au moins deux à six cycles aromatiques fusionnés. Au sens strict ils ne contiennent que des atomes de carbone et d'hydrogène.

Deux types de HAP sont distingués :

- les pétrogéniques : se dit des hydrocarbures présents dans les bruts pétroliers, d'origine naturelle qui se caractérisent par une forte proportion d'hydrocarbures ramifiés.
- les pyrogéniques : se dit des hydrocarbures produits par combustion de matière organique (riche en carbone, combustibles fossiles ou bois) (Neff, 1985). Ces hydrocarbures dont l'origine est liée à l'activité humaine, sont considérés comme des polluants primaires. Ce sont ces HAP qui prédominent dans l'environnement. Ce sont principalement les composés non-ramifiés.

Les HAP sont produits lors de la combustion et particulièrement celle de la biomasse qui s'effectue souvent dans des conditions mal maîtrisées (par exemple en foyer ouvert). La combustion du bois dans le secteur résidentiel et le transport routier représentent respectivement 37% et 32% des émissions annuelles.

Le benzo[a]pyrène est présent dans les suies et fumées de toute origine telle que les gaz d'échappement des moteurs à explosion et la fumée de cigarette (Kuller et *al.*, 1986), ou dans la nourriture cuite au barbecue (INRS 1997, ATDSR 1995). Les taux atmosphériques demeurent relativement faibles (de l'ordre du  $\text{ng/m}^3$  pour les HAP et du  $\text{pg/m}^3$  pour les dioxines).

### **1. Structure et caractéristiques des HAP**

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques, communément appelés HAP, sont une famille de composés chimiques constitués d'atomes de carbone et d'hydrogène dont la structure des molécules comprend au moins deux (naphtalène) à six cycles (benzo[g,h,i]pérylène) aromatiques condensés (Tableaux 5 ; 6). Ces molécules sont planes, rigides, non polaires. Leur masse molaire varie de 166 à plus de  $300 \text{ g.mol}^{-1}$ . Ils ont un point de fusion supérieur à  $100^\circ\text{C}$  et un point d'ébullition élevé (supérieur à  $3000^\circ\text{C}$ ). Les noyaux aromatiques rendent les HAP très hydrophobes, leur hydrophobie augmente avec le nombre de cycles aromatiques, alors que leur solubilité et leur volatilité diminuent (Tableau 5).

Depuis de nombreuses années, les HAP sont très étudiés car ce sont des composés présents dans tous les milieux environnementaux et qui montrent une forte toxicité. Ils font partie des polluants organiques persistants (POPs). D'ailleurs, c'est une des raisons qui a conduit à leur ajout dans la liste des polluants prioritaires par l'agence de protection de l'environnement des Etats-Unis (EPA US Environmental Protection Agency), dès 1976. Aujourd'hui, ils font également partie des listes de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) et de la communauté européenne (Tableau 1).

**Tableau 6** : Concentration des HAP (mg.kg<sup>-1</sup> de sol) dans les sols contaminés (Jushasz et Naidu, 2000)

HAP	Ellis et al. (1991)	Mueller et al. (1991)	Bewley et al. (1989)	Jushasz (1998)	Bogan et al. (1999)
Sites					
Concentration (mg.kg <sup>-1</sup> de sol)	Production de crésote	traitement de bois	Usine à gaz	Pétrochimique	Usine à gaz (COGEMA)
Naphtalène	1131	3925	-	186	-
Acénaphthalène	33	49	-	-	28
Acénaphène	-	1368	2	43	2
Fluorène	650	1792	225	87	4
Phénanthrène	1595	4434	379	156	51
Anthracène	334	3307	156	53	58
Fluoranthène	682	1629	2174	137	195
Pyrène	642	1303	491	99	173
Chrysène	614	481	345	-	52
Benzo(a)pyrène	-	171	317	33	88
Benzo(b,k)fluoranthène	-	2271	498	-	99
Dibenzo(a,h)anthracène	-	192	2451	12	-
Indéno(1,2,3-c,d)pyrène	-	120	207	-	46
Somme HAP	5863	70633	7331	821	974
% benzo[a]pyrène	0	0,44	1,25	1,46	10,88

## 2. Effets sur la santé

Les HAP sont des composés très lipophiles et sont très toxiques. Cette toxicité est démontrée suite à de multiples expérimentations et observations (Fries et Marrow, 1992 ; Abraham *et al.*, 1989 ; Olling *et al.*, 1991). De nombreux effets néfastes ont été observés dans le cadre de ces études dont principalement une augmentation de la fréquence de cancer chez les animaux exposés.

Suite à ces observations, et dans le but de diminuer les risques éventuels en terme de santé publique, des modèles mathématiques ont été mis en place (TEQ, TEF,  $\log K_{ow}$ ).

Les Doses Quotidiennes Tolérables (TDI) pour l'être humain représentent une application concrète de cette méthode mathématique (Tableau 3).

L'Organisation Mondiale de la Santé, OMS (1999 cité par INSERM, 2000) a établi une TDI comprise entre 1 et 4 pg TEQ/kg de poids corporel/jour. L'US-EPA a opté pour un niveau d'exposition maximale recommandée de 0,006 pg TEQ/kg de poids corporel/jour pour une durée de vie de 70 ans, le risque de développer un cancer étant sous ces conditions de  $10^{-6}$  (Silbergeld, 1993).

Contrairement aux dioxines, les HAP, deviennent des molécules toxiques suite à des dégradations des formes parents (Laurent C., 2002). Beaune et Loriot, 2000, ont démontré que les diol-époxydes, formés lors du catabolisme de la région « baie » du benzo[a]pyrène par le système monooxygénase NADPH dépendante du cytochrome P450, sont toxiques pour les cellules hôtes.

## 3. Mécanisme d'action des HAP

En raison de leur caractère lipophile, les HAP s'accumulent dans les organismes vivants, préférentiellement dans les tissus lipidiques. La plupart des organismes ont la capacité de métaboliser les HAP par action de l'enzyme cytochrome P450 (Varanasi, 1989). La remobilisation des HAP métabolisés permet leur excrétion de l'organisme mais aussi les rendent toxiques. En effet, les HAP deviennent toxiques principalement lorsque les métabolites hydrophiles se fixent sur les structures cellulaires (protéines, ADN). La modification de l'ADN induit alors des effets cancérigènes et mutagènes (Baird *et al.*, 2002).

D'autre part, les HAP sont photodégradables, ce qui peut aussi induire une photo-toxicité. Certains HAP sont particulièrement photo-toxiques sous lumière ultra violet (UV). Le mécanisme d'action de ces composés repose en grande partie sur leur interaction avec le récepteur d'hydrocarbures aromatiques cytosolique Ah (AhR) qui, à l'état de repos, forme un

complexe avec une protéine de choc thermique Hsp90. La liaison du polluant à l'AhR (récepteur aryl hydrocarbon) entraîne une dissociation de ce complexe. L'association AhR-polluant migre alors vers le noyau où elle se lie à la protéine Arnt (Ah Recepteur de Translocation Nucléaire). Enfin, ce nouveau complexe va se fixer à diverses séquences (récepteur aryl hydrocarbon) entraîne une dissociation de ce complexe. L'association AhR-polluant migre alors vers le noyau où elle se lie à la protéine Arnt (Ah Recepteur de Translocation Nucléaire). Enfin, ce nouveau complexe va se fixer à diverses séquences d'ADN appelées "éléments de réponse aux xénobiotiques" (XRE) pour former un ensemble qui, via un promoteur, modulera l'activité transcriptionnelle de nombreux gènes dont ceux qui affectent la production de cytochromes P450 (Lucier et *al.*, 1993). D'autres paramètres rentrent également en jeu, en particulier l'affinité du polluant pour l'AhR, la masse graisseuse, etc. Le récepteur Ah pouvant être complexé ou non à des protéines cytosoliques présentant différentes formes alléliques qui engendrent des affinités variables entre le récepteur Ah et les micropolluants qui pourraient en partie expliquer les sensibilités génétiques ou environnementales propres à chacun des êtres vivants.

**Tableau 7** : Variations de la réponse lipolytique aux catécholamines dans le tissu adipeux humain (Langin D., 2000).

Situations physiologiques et pathologiques	Réponse lipolytique	Niveau de modulation
Période néonatale	Diminution	Réponse $\alpha_2$ -adrénergique _
Vieillesse	Diminution	Activation de la LHS _
Différenciations selon le sexe	Variable	Modification des effets $\alpha_2$ - et $\beta$ -adrénergiques Expression de la LHS corrélée positivement à la taille cellulaire
Différences territoriales	Variable	idem
Régimes à basses calories	Augmentation	Expression de la LHS _
Exercice	Augmentation	Réponse $\beta$ -adrénergique _
Obésité	Diminuée	Expression de la LHS et du récepteur $\beta_2$ -adrénergiques _
Syndrome de résistance à l'insuline	Diminuée	Activation de la LHS et nombre de récepteurs $\beta_2$ -adrénergiques _
Résistance aux catécholamines	Diminuée	Réponse et nombre de récepteurs $\beta_2$ -adrénergiques _
Hyperlipidémie familiale combinée	Diminuée	Expression de la LHS _
Syndrome des ovaires polykystiques	Diminuée	Activation de la LHS et nombre de récepteurs $\beta_2$ -adrénergiques _
Hypothyroïdisme	Diminuée	Activation de la LHS_
Hyperthyroïdisme	Augmentée	Nombre de récepteurs $\beta$ -adrénergiques _
Syndrome de Cushing	Diminuée	Inconnu
Phéochromocytome	Diminuée	Inconnu
Diabète de type I	Augmentée	Réponse $\beta$ -adrénergique _
Microgravité	Augmentée	Réponse $\beta$ -adrénergique _
Infusion d'adrénaline	Diminuée	Réponse $\beta$ -adrénergique _

#### 4. Métabolisme des HAP

L'adaptation des êtres vivants à des milieux endommagés par différents types de pollution se traduit par la mise en place et le développement de système de défense (Pain et *al.*, 2003). Les premières barrières sont mises en place au niveau de l'organisme entier et constituent des protections physiques (coquille, peau, etc.) contre la pénétration des xénobiotiques (composés exogènes étrangers à l'organisme). Au niveau cellulaire, la protection s'organise essentiellement autour de deux voies principales : la voie de bio-transformation des xénobiotiques, qui permet la neutralisation puis l'élimination des molécules toxiques et un mécanisme de transport membranaire des xénobiotiques, qui limite l'accès de ces molécules à la cellule et favorise leur élimination. L'activité de ce mécanisme a été mise en évidence chez le mollusque bivalve dulçaquicole *Anodonta cygnea* dès 1989 (Kurelec et *al.*, 1989), avant d'être également observée chez d'autres espèces aquatiques, notamment chez des éponges, les mollusques gastéropodes et les poissons (Bard et *al.*, 2000). Il a rapidement été montré que cette voie est analogue au système de «résistance multidrogue» (MXR, Multi-Drug Résistance) identifié chez les mammifères (Gottesman et *al.*, 1993). Par analogie avec ce système, le mécanisme identifié dans les populations naturelles a été appelé MXR (MultiXenobiotic Resistance ou résistance multixénobiotique) que certains auteurs préfèrent désigner par MDMX (mécanisme de défense multixénobiotique) (Kurelec et *al.*, 1992 ; Parant et *al.*, 2001) qui figure parmi les biomarqueurs de stress environnemental.

#### 5. Métabolisme des xénobiotiques

Schématiquement on distingue 2 phases de métabolisme selon les processus utilisés par les enzymes impliquées : les réactions de phase I et celles de phase II.

##### *Réactions de phase I*

- **Les réactions d'oxydation** sont majoritairement localisées dans les microsomes hépatiques. Elles consomment du NADPH (Nicotinamide Phosphate réduit), de l'oxygène moléculaire et passent par les cytochromes P450 (Cossu et *al.*, 1996).
- **Les réactions de réduction** sont moins fréquentes. Elles se font aussi bien au niveau du foie que dans les intestins via la flore bactérienne.
- **L'hydrolyse** d'un ester ou d'un amide intervient dans le foie et dans différents tissus et même dans le plasma.

L'oxydation, la réduction et l'hydrolyse sont des biotransformations qui conduisent à des dérivés dont les groupements fonctionnels sont des hydroxyles (OH), des amines (NH<sub>2</sub>) ou des carboxyles (COOH).

### ***Réactions de phase II***

***La conjugaison*** des groupements fonctionnels issus des réactions de phase I. Chez l'homme, elle fait généralement appel à l'acide glucuronique, au glycolle, au sulfate ou à l'acétyl. Les dérivées de la glucuroconjugaison sont très hydrosolubles qui sont facilement éliminés dans les urines et la bile.

# **Partie 1**

## **Chapitre 2 :**

### **Les travaux de l'équipe...**

#### **1. Travaux sur le tissu adipeux**

Dans ses travaux sur le rôle du tissu adipeux dans la mise en réserve de polluants dioxiniques Philippe Irigaray a observé que, exposées par voie intra péritonéale à de faibles quantités de polluants les souris grossissaient.

Le modèle qu'il a développé est celui de la souris mâle C57bl/6J nourrie ad libitum et intoxiquée par voie intra péritonéale tous les deux jours avec du B[a]P à la dose de 0,5 mg/kg de poids. La prise de poids au bout de 12 jours est doublée par rapport à la croissance des souris « non polluées ».

#### **2. Travaux de Grova et coll**

Dans un travail réalisé par Grova et *al.*, 2005 sous la direction des Professeurs Henri Schroeder et Claude Muller dans l'une des équipes de l'Unité de Recherche: Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux, il a été montré que des rats «intoxiqués» par de fortes doses de ben[a]pyrène (B[a]P) : 20 ou 200 mg/kg de masse corporelle maigrissaient, alors que l'administration de doses plus faibles (0,02 ou 0,2 mg/kg de masse corporelle) conduisait à une prise de poids significative. L'effet « toxique » se traduisait par l'amaigrissement induit par le dysfonctionnement des fonctions métaboliques. Par contre, l'effet de faibles doses était plus étrange : l'absence d'effet aurait traduit l'action des défenses naturelles de l'organisme vis-à-vis de « l'hôte » toxique. Par contre la prise de poids significative mérite une attention particulière.

#### **3. Observation de Philippe Irigaray**

Cette observation confirmait celles de Philippe Irigaray et démontrait que le phénomène de l'obésité n'existait que par l'administration de petites quantités de polluants suggérant qu'il procède du schéma de l'action pharmacologique.

**Ces observations antérieures pouvaient suggérer l'existence d'une autre explication dans l'apparition de l'augmentation de la fréquence de l'obésité qui procèderait alors d'un lien à définir entre l'environnement et l'obésité.**

L'exploration morphologique des animaux a montré que ces animaux prenaient du poids par augmentation de leur masse grasse.

#### **4. Faits expérimentaux**

Des études faites à l'URAFPA ont montré les risques de transfert des polluants déposés sur les matrices environnementales (l'herbe, le sol, les cours d'eau, etc.) vers la chaîne alimentaire (Lutz et *al.*, 2006 ; Grova et *al.*, 2000, 2003 ; Laurent et *al.*, 2002).

##### **4.1. Les travaux de Plant et *al.*, (1985) et de Jimenez (2002)**

Les travaux de Plant et *al.*, (1985) et de Jimenez et *al.*, (2002) ont montré une internalisation des polluants dans la bicouche lipidique de la cellule adipeuse des organismes aquatiques.

Dans les organismes terrestres y compris les végétaux, diverses expériences ont montré que le B[a]P (benzo[a]pyrène) présent dans l'environnement pouvait être fixé par les plantes à la fois via leurs racines (sol) et leurs feuilles (air). Le passage des racines vers les parties superficielles des plantes dans le cas d'un sol pollué, et/ou des parties superficielles vers les racines si l'atmosphère est polluée, a été démontré sur certaines plantes (Edwards, 1983).

Chez l'homme, très peu d'études ont cherché à identifier les effets toxiques des HAP administré en aigu ; la plupart des données concerne des mélanges d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (Irigaray et *al.*, 2005).

Des études ont été réalisées afin d'observer le comportement des membranes, par définition amphiphiles, face à un composé fortement lipophile comme le B[a]P et d'autres HAP. En effet l'accumulation des molécules d'hydrocarbure a comme conséquence le gonflement de la bicouche lipidique avec également en parallèle, une augmentation de la fluidité des membranes. Cet effet sur l'intégralité de la membrane affecte le fonctionnement de la membrane et des protéines incorporées à la membrane (Sikkema et *al.*, 1994). La lipophilie du B[a]P et d'autres molécules, fait que le mécanisme principal de l'"incorporation" cellulaire du B[a]P et d'autres hydrocarbures aromatiques polycycliques depuis les lipoprotéines vers les cellules est un transfert spontané (Plant et *al.*, 1985).

#### **4.2. Les travaux de Thèse menée par Philippe Irigaray**

Les travaux de Thèse menée par Philippe Irigaray, sur des souris, ont montré qu'un certain type de polluants le benzo[a] pyrène ou la dioxine, émis par les moteurs de voitures, les barbecues ou les usines d'incinération, opéraient comme des bêta-bloquants sur les cellules adipeuses. « *Le système de sortie des acides gras de la cellule est bloqué et les adipocytes ou cellules adipeuses se multiplient* » Luc Méjean, 2006. « *La dose de polluants administrée était 100 fois plus faible qu'une dose toxique mais équivalente à une exposition qu'on peut trouver à 100 mètres d'une autoroute* », Luc Méjean, 2006. Outre un éventuel facteur d'obésité, ces molécules bêta-bloquantes peuvent expliquer la montée des allergies et de l'asthme.

#### **4.3. Produits de combustion incomplète**

En 1983, une publication avait suggéré un lien entre l'indice de masse corporelle (IMC) et la présence de polluants issus de combustions incomplètes, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) tels que les benzo[a]pyrène ou la dioxine. Mais les recherches menées sur ce sujet s'étaient depuis limitées à l'étude du passage de ces polluants aux végétaux ou aux animaux jusqu'à leur excrétion dans le lait animal. « Depuis 1999, les chercheurs de URAFPA ont montré que ces substances pénètrent et quittent la cellule parallèlement aux acides gras. Néanmoins, si l'entrée des HAP se fait proportionnellement à celle des adipocytes, ces substances exercent un effet négatif sur la sortie des acides gras » Luc Méjean, 2006.

#### **4.4. Modèles de souris transgéniques pour étudier l'obésité**

Pour obtenir des souris ayant une réceptivité adrénergique à celle de l'homme, un transgène correspondant au récepteur  $\alpha_2$ -adrénergique humain doit être introduit chez les souris dépourvues de récepteurs  $\beta_3$  ( $\beta_3^-/-$ ) développés par Susulic V., 1995 (laboratoire de B. Lowell, université de Harvard, Boston).

Cette construction génique particulière a été mise au point, elle comprend le promoteur ( $\alpha P_2$ ) d'un gène sélectivement exprimé dans le tissu adipeux placé en amont de la séquence du gène  $\alpha_2C10$  codant pour le récepteur  $\alpha_2A$ -adrénergique humain. La spécificité de ce promoteur permet ainsi au récepteur  $\alpha_2A$ -adrénergique humain d'être exprimé uniquement dans le tissu adipeux de ces souris.

L'analyse réalisée sur les premières souris transgéniques montre que les récepteurs  $\alpha_2A$ -adrénergiques humains sont présents dans le tissu adipeux et sont fonctionnels. De plus un régime hyperlipidique entraîne chez ces animaux le même phénotype que pour les souris exprimant le récepteur  $\alpha_2A$ -adrénergique sous le contrôle du promoteur aP2.

Ces observations viennent étayer l'existence d'un lien entre l'équipement en récepteurs adrénergiques du tissu adipeux et la nature du régime alimentaire.

Ces modèles de souris transgéniques dont la réceptivité adrénergique du tissu adipeux est comparable à celle de l'homme, vont nous permettre de mieux comprendre les mécanismes qui conduisent au développement d'une telle obésité nutritionnelle surtout dans un environnement pollué.

#### **4.5. Un impact sur certains gènes**

Par ailleurs, Irigaray et *al.*, 2005 ont procédé à une analyse histologique des adipocytes mis en contact avec des HAP. L'examen par PCR quantitative des gènes exprimés au niveau du tissu adipeux révèle que le benzo[a]pyrène induit une diminution importante de l'expression des gènes codant pour les récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_3$ , la protéine kinase A, la lipase hormono-sensible, les périlipines, le PPAR $\gamma$ , la lipoprotéine lipase et l'acyltransférase. L'adipocyte soumis à cette intoxication par les HAP perd une grande partie de sa capacité à mobiliser les lipides lorsque les agents polluants agissent par interaction avec un récepteur à sept domaines transmembranaires. « Il semblerait que les polluants existant sous forme de molécules plates puissent bloquer les récepteurs membranaires dotés de sept sous-unités c'est-à-dire bêta-adrénergiques et à l'ACTH et modifient ainsi les mouvements lipidiques transmembranaires des adipocytes sans action directe sur les chaînes lipidique » Luc Méjean, (2006). Les axes de recherche du laboratoire passent maintenant par la confirmation de ces données préliminaires, par une caractérisation de l'effet des HAP sur d'autres types cellulaires (cellules vasculaires, bronchiques...) et par la mise en place d'études épidémiologiques, notamment chez les personnes particulièrement exposées aux HAP (vivant à côté d'une autoroute, d'une usine d'incinération ou d'usines polluantes).

#### **4.6. Réaction en chaîne par polymérase**

L'expérience est reproduite avec un résultat identique lorsque l'activateur de lipolyse est un activateur des récepteurs bêta ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$ ).

Une PCR (Réaction en chaîne par polymérase de l'anglais polymerase chain reaction) quantitative, réalisée sur 16 gènes du tissu adipeux et sur neuf gènes du tissu musculaire, a montré une diminution significative d'ARNm pour certaines protéines intervenant dans la cascade lipolytique au niveau des échantillons de tissu adipeux : c'est le cas des récepteurs  $\beta_2$  et  $\beta_3$  adrénergiques, de la lipoprotéine lipase et du diacylglycérol acyltransférase. Les échantillons de muscle traités de la même façon n'ont permis d'objectiver aucune différence entre les souris témoins et les souris ayant reçu du B[a]P (Irigaray P. et *al.*, 2005).

#### **4.7. Effet d'un autre activateur de lipolyse**

Par contre rien quand l'activateur de lipolyse ne passe pas par une activation des récepteurs bêta. C'est le cas de la lipolyse induite par l'ANP (peptide natriurétique de type A), par la stimulation de NPR-A (son récepteur), qui contient un seul domaine transmembranaire.

#### **4.8. Effet des polluants sur la lipogenèse induite par l'insuline et/ou la prise alimentaire**

Aucun effet des polluants sur la lipogenèse induite par l'insuline et/ou la prise alimentaire.

#### **4.9. Effet sur d'autres HAP**

Le phénomène sur la lipolyse peut être reproduit avec plusieurs HAP mais pas tous...En effet la lipolyse induite par activation des récepteurs aux peptides natriurétiques n'a pas été affectée par la présence de polluants.

#### **4.10. Effet d'autres polluants**

Le phénomène sur la lipolyse peut être reproduit avec d'autres polluants : PCB, dioxine, acrylamide. Les effets démontrés à partir du B[a]P ne sont pas spécifiques des hydrocarbures polycycliques (HAP) : d'autres polluants présentent le même effet.

#### **4.11. Lipolyse induite par l'ACTH**

Comme dans le cas des récepteurs adrénergiques, la lipolyse induite par l'ACTH (lipolyse qui met en jeu un autre type de récepteur, le MC2-R) est perturbée par le B[a]P.

## 5. But de la thèse

Le but de ma Thèse est d'apporter une contribution à l'étude de ce phénomène et non pas de résoudre les problèmes de l'obésité. Il s'agit dans un premier temps d'étudier l'interaction hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)-récepteurs  $\beta$ -adrénergiques et dans un deuxième temps leurs actions sur la membrane cytoplasmique de la cellule adipeuse substituée ici par des membranes modèles (bicouches phospholipidiques artificielles).

A cet effet, nous avons utilisé deux méthodes d'investigation de l'accumulation des polluants aromatiques polycycliques (HAP) dans la membrane adipocytaire, en étudiant cette accumulation dans des membranes modèles. Dans ce but, nous avons utilisé des vésicules géantes (GUVs) de DOPC (1,2-dioléoyl-sn-glycero-3-phosphocholine). Dans une première méthode, du pyrène ( $C_{16}H_{10}$ ) ou du fluoranthène ( $C_{16}H_{10}$ ), deux polluants HAP, ont été incorporés dans la membrane dès la fabrication des GUVs : nous avons testé des concentrations d'une ou deux molécules de polluant pour deux molécules de phospholipide.

Dans une seconde configuration, nous avons introduit des GUVs de DOPC dans des solutions de glucose incorporant les polluants à des concentrations micromolaires, et nous avons mis en évidence une incorporation des polluants dans la membrane. L'observation quantitative de la fluorescence des vésicules au moyen de la microscopie optique, nous a permis de calculer les concentrations de polluant dans les membranes dans cette seconde configuration.

L'accumulation des polluants au niveau des vésicules de phospholipide peut être assimilée à l'accumulation des polluants au niveau de la membrane adipocytaire. Ainsi la cellule adipeuse peut servir de lieu de stockage aux toxiques liposolubles. Ces derniers pouvant désorganiser le fonctionnement de la cellule et empêcher la libération d'acides gras et de glycérol.

## Partie 2

### Effet sur les récepteurs

#### A. Les récepteurs adrénérgiques (récepteurs membranaires)

Les effets des catécholamines sur leurs cellules cibles impliquent des récepteurs membranaires : les récepteurs adrénérgiques (Castan-Laurell et *al.*, 2002). Il y a deux sortes de récepteurs adrénérgiques : les récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  adrénérgiques qui sont des structures moléculaires situées dans différents organes, ayant la propriété de réagir aux médiateurs chimiques (ou neurotransmetteurs) adrénérgiques (dopamine et noradrénaline). Ils sont une classe de récepteurs couplés aux protéines G (Gilman, 1987 ; Rodbell, 1994 ; Dixon, 1994) qui sont la cible des catécholamines. Il se lie de préférence à leurs ligands endogènes, les catécholamines adrénaline et noradrénaline et sont activés par elles.

Le concept de dualité fonctionnelle des récepteurs adrénérgiques introduit par Alquist en 1948 est toujours d'actualité car, malgré l'existence de neuf sous-types de récepteurs adrénérgiques (cinq d'entre eux sont présents dans l'adipocyte). L'action des catécholamines sur l'adipocyte peut entraîner aussi bien l'activation que l'inhibition de la lipolyse (hydrolyse des triglycérides stockés dans la cellule) selon le type de récepteur recruté. En effet, de par leur action sur les récepteurs  $\beta$ -adrénérgiques couplés positivement à l'adényl cyclase et à la production d'AMPc, les catécholamines activent la lipase hormonosensible (LHS) et donc la lipolyse (Langin et *al.*, 2000 ; Arner et *al.*, 1999) alors qu'en stimulant des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénérgiques, elles exercent un effet antilipolytique (Castan-Laurell et *al.*, 2002). Les trois sous-types de récepteurs  $\beta$ -adrénérgiques sont capables d'activer la lipolyse ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ).

La structure et la fonction des récepteurs  $\beta$ -adrénérgiques ont été sujets de plusieurs investigations durant ces 10 dernières décennies. Fraser (1980- 1981), a suggéré que les récepteurs  $\beta$ -adrénérgiques de tout genre sont proches des protéines sous deux aspects : régulation hormonale (glucocorticoïde) et régulation immunologique, ce qui peut avoir d'importantes implications dans les maladies humaines.

Dixon et *al.*, (1986) ont révélé la structure et la régulation des récepteurs  $\beta$ -adrénérgiques parmi les espèces d'humains, de rongeurs et d'oiseaux.

Par ailleurs, la comparaison des données des séquences des protéines de récepteurs  $\beta$ -adrénérgiques humains avec ceux des récepteurs muscariniques et cholinergiques du cerveau

de cochon, a démontré un haut degré de ressemblance entre les classes de récepteurs dans le dictionnaire de pharmacologie.

Des conclusions ont confirmé que les récepteurs adrénergiques, muscariniques et cholinergiques partagent une significative homologie structurelle et suggèrent fortement que les récepteurs neurotransmetteurs sont peut-être à multiples gènes appartenant à un commun gène ancestral .

Dans le souci de connaître l'organisation génomique des gènes des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, Dixon et *al.*, (1986), ont projeté d'étudier le génome de l'ADN de leucocyte humain avec le radioligand du clone CLFV-108.

## **1. Les récepteurs $\alpha$ -adrénergiques**

Les principaux récepteurs adrénergiques sont des protéines à sept domaines membranaires (Figure 11) (Liitti et *al.*, 2001). Les principaux récepteurs adrénergiques sont les suivants :

### **1.1. Les récepteurs $\alpha_1$**

**Agoniste** : phényléphrine / **antagoniste** : prosazine. Sont post synaptiques, leur stimulation entraîne une vasoconstriction, ainsi qu'une pro-agrégation plaquettaire et une contraction utérine (Basnar et *al.*, 2000).

### **1.2. Les récepteurs $\alpha_2$**

Pré et post synaptiques. Majoritairement situés dans l'encéphale, la stimulation de ces récepteurs provoque une diminution du tonus du système sympathique. Parmi les trois sous-types de récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques, seul le sous-type  $\alpha_2A$  est exprimé dans l'adipocyte humain (Castan-Laurell et *al.*, 2002). Son efficacité est très réduite dans les adipocytes de la plupart des rongeurs alors qu'elle est particulièrement importante dans l'adipocyte de l'homme et des primates. Le niveau d'expression des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques varie selon la localisation anatomique du tissu adipeux, l'âge et le sexe.

## **2. Les récepteurs $\beta$ -adrénergiques**

### **2.1. Les récepteurs $\beta_1$ -adrénergiques**

**Agoniste** : isoprenaline / **Antagoniste** : propranolol. Ils sont situés au niveau du cœur. L'activation de ces récepteurs adrénergiques  $\beta_1$  entraîne une activation cardiaque donc la contraction des fibres myocardiques.

Des études sur l'effet du sexe et du statut d'entraînement sur la densité myocardique des récepteurs  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ -adrénergiques et  $M_2$  muscariniques chez le rat Wistar ont montré les effets inotrope et chronotrope positifs des récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques et prédominant nettement sur ceux des  $\beta_2$ -AR (Steinberg S.F., 1999).

La classe de médicament appelée bêta-bloquants vont inhiber les récepteurs  $\beta$  entraînant une diminution de l'excitabilité des fibres cardiaques.

## 2.2. Les récepteurs $\beta_2$ -adrénergiques

Ils sont situés au niveau des fibres musculaires lisses du poumon et de l'utérus. Ces récepteurs servent à relaxer les fibres. Au niveau du poumon, ils évitent les spasmes bronchiques (asthme).

## 2.3. Les récepteurs $\beta_3$ -adrénergiques

Les récepteurs  $\beta_3$  sont, entre autres effets, impliqués dans la sensibilité de la cellule adipeuse à la lipolyse, ou plus exactement dans sa capacité à stocker les lipides ou au contraire à libérer leurs réserves de lipides en réponse à certaines hormones (les catécholamines). Il semblerait que les gènes des récepteurs adrénergiques jouent en fait un rôle mineur dans l'obésité humaine. Le récepteur  $\beta_3$ -adrénergique présent dans l'adipocyte de nombreux rongeurs et petits mammifères n'est que très faiblement ou pas exprimé dans l'adipocyte des primates et de l'homme (Lafontan et *al.*, 1995).

Les récepteurs  $\beta_3$ -adrénergiques auraient des effets inotropes négatifs et également des effets lusitropes positifs au moins dans le cœur de rat (Steinberg S.F., 1999).

On peut bloquer ou stimuler les récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$ .

## 3. Rôle des protéines G :

Les protéines G (leur nom est une abréviation de l'anglais guanine nucléotide binding proteins) sont des molécules de nature protéique qui permettent le transfert d'informations à l'intérieur de la cellule. On parle de transduction de signaux. Ces protéines sont appelées ainsi car elles utilisent l'échange de GDP en GTP comme un « interrupteur moléculaire » pour

déclencher ou inhiber des réactions biochimiques dans la cellule. Alfred G. Gilman et Martin Rodbell ont obtenu le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1994 pour leur découverte et leurs travaux sur les protéines G.

Les protéines G sont des intermédiaires de l'activation et de l'inhibition de l'adénylate cyclase. De nombreux récepteurs adrénergiques et des récepteurs d'hormones polypeptidiques induisent la formation d'AMPc comme second messager (médiateur intracellulaire). L'AMPc active ou inhibe de nombreuses enzymes ou des cascades enzymatiques, en favorisant leur phosphorylation et leur déphosphorylation. Lorsqu'un récepteur de ce type fixe l'hormone correspondante, il active un complexe membranaire protéique G.GDP, en stimulant l'échange GDP/GTP. Le complexe protéique G.GTP qui en résulte active à son tour l'adénylate cyclase, mais cette activation est de courte durée car la protéine G hydrolyse le GTP en GDP + Pi à une vitesse de 2 à 3 min.<sup>-1</sup>, entraînant ainsi le retour à l'état initial inactif.

Néanmoins ce système amplifie le signal hormonal car chaque complexe hormone-récepteur active de nombreuses protéines G avant de devenir inactif et, pendant cette période, chaque complexe protéine G.GTP.adénylate cyclase catalyse la synthèse d'un grand nombre de molécules d'AMPc.

Comme l'ont montré Alfred Gilman et Martin Rodbell (1994), les protéines G sont plus complexes : elles sont formées de trois sous-unités,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  (respectivement de masses moléculaires égales à 45, 37 et 9 kDa). Plusieurs types de récepteurs hormonaux peuvent activer la même protéine G inactive. C'est le cas par exemple, dans les hépatocytes, des récepteurs de glucagon et des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques lors de la fixation de leurs hormones respectives. La quantité d'AMPc produite est alors la somme de celles induites séparément par chaque hormone.

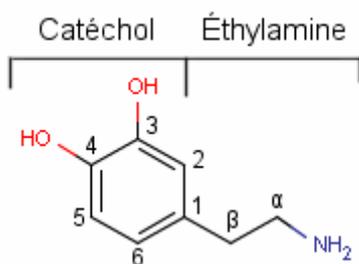
Les protéines G peuvent également agir autrement qu'en activant l'adénylate cyclase : elles peuvent par exemple, stimuler l'ouverture des canaux potassiques dans les cellules cardiaques et participer au système de signalisation faisant intervenir des inositol-phosphates.

Néanmoins, tous les récepteurs connus, dont l'action met en jeu une protéine G, sont des protéines à sept hélices transmembranaires comme par exemple le récepteur  $\beta$ -adrénergique.

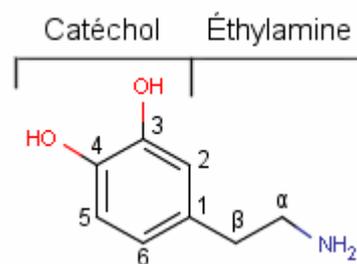
Certains récepteurs hormonaux inhibent l'adénylate cyclase au lieu de la stimuler. C'est le cas des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques et des récepteurs à la somatostatine et aux opioïdes.

Les récepteurs  $\alpha_2$  ( $\alpha_2$ -AR) et  $\beta$ -adrénergiques ( $\beta$ -AR) sont couplés négativement respectivement via les protéines Gi et positivement vers les protéines Gs à l'adénylyl cyclase et contrôlent la production d'AMP cyclique. La teneur en AMPc dépend également de

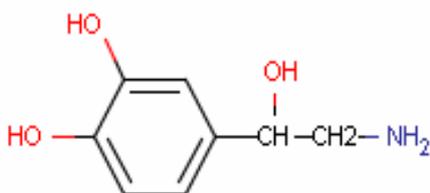
l'activité de la phosphodiesterase 3B (PDE 3B) qui dégrade l'AMPc en 5'AMP. L'AMPc produit active la protéine kinase A, qui à son tour, phosphoryle et stimule la lipase hormonosensible (LHS) afin de permettre sa translocation au niveau de la gouttelette lipidique. Les triglycérides (TG) sont alors hydrolysés en di-acylglycérol (DG) et mono-acylglycérol (MG). Une monoglycéride lipase hydrolyse ensuite les monoglycérides. La mobilisation des TG de réserve ou lipolyse conduit ainsi à la libération dans le compartiment sanguin de glycérol et d'acides gras non estérifiés (AGL) (Lafontan *et al.*, 1995 ; Arner *et al.*,1999).



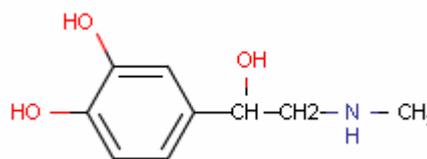
**Figure 7** : Structure de base d'une catécholamine



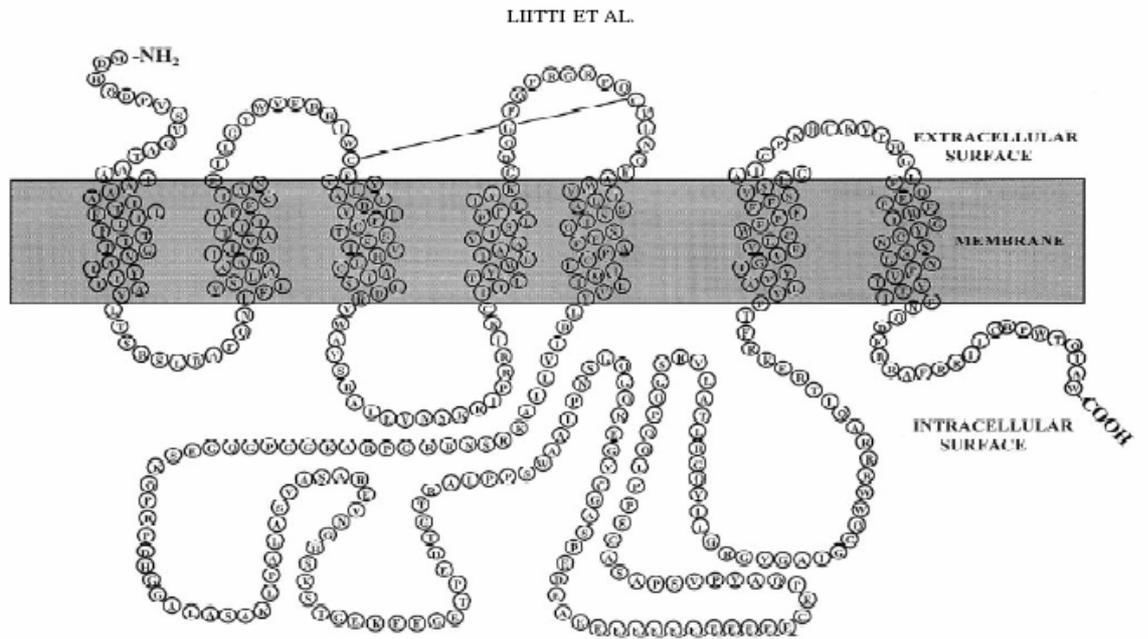
**Figure 8** : Structure de la noradrénaline



**Figure 9** : Structure de la dopamine

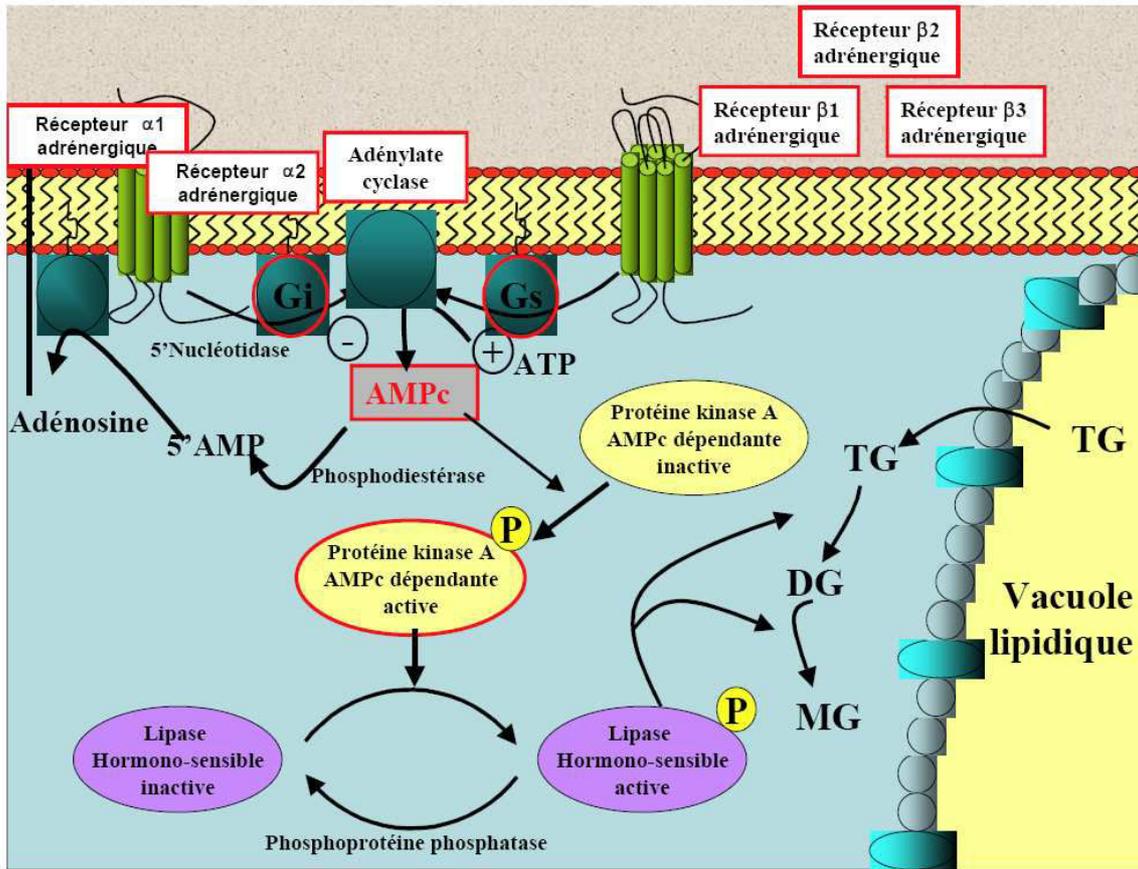


**Figure 10** : Structure de l'adrénaline



LIITTI et *al.*, 2001

**Figure 11** : Structure à sept domaines membranaires du récepteur  $\alpha_2C_2$ -adrénergique humain (séquence d'acides aminés).



**Figure 12** : Schéma des voies enzymatiques mises en jeu dans la lipolyse induite à partir des récepteurs membranaires  $\alpha$  et  $\beta$ -adrénergiques

## **B. Désensibilisation des récepteurs adrénergiques**

Les récepteurs sont sujets à la désensibilisation. Une des caractéristiques des systèmes de signalisation biologique est qu'ils s'adaptent à des stimuli de longue durée en réduisant leur temps de réponse. C'est un phénomène connu sous le nom de désensibilisation. Ces systèmes de signalisation répondent plus à des variations du niveau de stimulation qu'à leurs valeurs absolues.

### **1. Mécanisme de désensibilisation**

La stimulation répétée et prolongée des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques par un agoniste peut induire une baisse progressive de l'intensité de la réponse : c'est la désensibilisation (Voet *al.*, 1998 ; Pollard et *al.*, 2004). Cette désensibilisation serait liée à l'inactivation des récepteurs par des processus complexes de phosphorylation, de découplage et d'internalisation éventuellement associée à une dégradation endosomale. L'ensemble de ces processus conduit à une diminution progressive du nombre de récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques fonctionnels (Lipworth et *al.*, 2000).

La fixation du ligand induit l'activation du récepteur ; ce dernier se sépare des protéines chaperons (HSP 70 et 90 etc.) qui le maintiennent inactif dans le cytoplasme.

La résistance des muscles lisses bronchiques au phénomène de désensibilisation aux effets des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques est liée à la présence du nombre de récepteurs de réserve et au renouvellement rapide des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques par les cellules musculaires.

Dans le cas des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, une exposition continue à l'adrénaline conduit à la phosphorylation d'au moins un résidu Ser du récepteur. Cette phosphorylation, catalysée par une kinase spécifique qui agit sur le complexe hormone-récepteur mais non sur le récepteur seul, diminue l'influence de l'hormone sur la protéine G (R.A. Dixon, 1994), du moins en partie, en réduisant l'affinité de l'adrénaline pour son récepteur. De plus, les récepteurs phosphorylés sont captés par endocytose dans des vésicules spécialisées dépourvues de protéines G et l'adénylate cyclase, atténuant ainsi la réponse cellulaire à l'adrénaline. Si le niveau de cette dernière diminue, le récepteur est lentement déphosphorylé par une phosphatase et retourne à la surface cellulaire, restaurant la sensibilité de la cellule vis-à-vis de l'adrénaline.

## 2. Altérations de la réponse lipolytique aux catécholamines

Les modifications physiologiques et pathologiques de la réponse aux catécholamines dans les adipocytes humains sont récapitulées dans le tableau 7.

Ces résultats ont été obtenus lors d'études *in vitro* sur adipocytes isolés ou en utilisant la technique de microdialyse *in situ* (Langin et *al.*, 1996) et sur des souris transgéniques ayant une réceptivité adrénergique du tissu adipeux comparable à celle de l'homme (Castan-Laurell et *al.*, 2002).

Une série d'études conduites au laboratoire en collaboration avec l'équipe de Vladimir Stich (Université Charles, Prague) a porté sur les modifications de l'équilibre entre les voies  $\alpha_2$ - et  $\beta$ -adrénergiques et leur signification physiopathologique.

L'exercice physique a été utilisé comme modèle d'activation du système nerveux sympathique. Dans un premier temps, les hommes jeunes non obèses ont été soumis à deux périodes de 60 min d'exercice en aérobie à 50% de la  $VO_2$  max. L'augmentation des taux plasmatiques de noradrénaline a été comparable lors de deux périodes alors que l'augmentation des taux d'adrénaline était 2,5 fois plus élevée lors du second exercice.

Les réponses métaboliques ont été mesurées dans la sonde de microdialyse en présence ou en absence d'un antagoniste  $\alpha_2$ -adrénergique, la phentolamine. Les concentrations de glycérol extra-cellulaire, index de la lipolyse *in situ*, étaient deux fois plus élevées lors du second exercice en situation basale. En présence de phentolamine, les concentrations de glycérol étaient plus élevées lors des deux périodes mais l'augmentation n'était significative que lors du deuxième exercice. Ce travail montre que l'activation des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques contribue au contrôle de la lipolyse *in vivo* (Langin et *al.*, 1999).

Lors d'un deuxième protocole, les effets d'un exercice de 60 min ont été étudiés chez des patients obèses et des sujets témoins. Les concentrations plasmatiques de catécholamines ne différaient pas entre les deux groupes. En situation basale, les concentrations plasmatique et extra-cellulaire de glycérol étaient plus élevées chez les patients obèses. Durant l'exercice, l'augmentation de la concentration extra-cellulaire de glycérol était beaucoup plus faible chez les patients obèses. Une perfusion de phentolamine ne modifiait pas la réponse chez les sujets témoins mais augmentait fortement la concentration extracellulaire de glycérol chez les sujets obèses.

Cette étude révèle que l'activation physiologique des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques durant l'exercice contribue fortement à l'altération de la réponse lipolytique aux catécholamines dans le tissu adipeux des patients obèses.

Ces résultats qui doivent être confirmés dans d'autres situations physiopathologiques suggèrent qu'une diminution de la réponse  $\beta$ -adrénergique démasque la réponse antilipolytique  $\alpha_2$ -adrénergique et peut conduire à une capacité lipolytique altérée (Langin et al., 1996).

La démonstration d'un rôle des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques peut avoir des implications chez les hommes développant de larges quantités de tissu adipeux sous-cutané ou chez les femmes ayant des dépôts adipeux fémoraux importants. La diminution de la capacité lipolytique des adipocytes hypertrophiés due à une plus forte expression des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques peut être bénéfique en limitant un excès de libération d'acides gras dans le courant sanguin. Par ailleurs, on peut émettre l'hypothèse que les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques jouent un rôle dans la résistance à la diminution de la masse de tissu adipeux sous-cutané lors de régimes hypocaloriques et de programmes d'exercice physique. Dans ces situations, une administration orale ou locale d'un antagoniste  $\alpha_2$ -adrénergique est une stratégie thérapeutique envisageable.

### **C. Mise en évidence de l'accumulation des polluants HAP sur les récepteurs adrénérgiques**

Le but de l'expérimentation est d'investiguer l'action directe possible des polluants (HAP) sur les récepteurs adrénérgiques.

A cet effet, des agonistes et des antagonistes spécifiques et non spécifiques ont été utilisés pour étudier le comportement des récepteurs  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$  face aux polluants (HAP).

Trois séries d'exploration ont été menées :

#### **1. Matériels et méthodes**

##### **1.1. Matériels**

###### **1.1.1. Etude in vitro de «binding» des récepteurs $\beta_3$ en présence de benzo[a]pyrène**

Le récepteur utilisé (réf cellules SK-NC d'origine endogène), le ligand (CYP marqué à l'iode 125 dans du propranolol (1 $\mu$ M) et les conditions d'incubation et de détermination sont identiques à la méthode de Curran et Fahman, 1996. Le « binding » (liaison) spécifique aux récepteurs est défini comme la différence entre le total binding et le «non spécifique binding» déterminé en présence de benzo[a]pyrène.

### **1.1.2. Etude in vitro de l'effet benzo[a]pyrène sur l'activité des récepteurs $\beta_1$**

Le récepteur utilisé est un recombinant humain (référence HEK -293 cellules) Curran et Fahman, 1996. La stimulation par l'isoproterenol (1nM) en incubation (30 min à 22°C) induit des modifications de concentration en AMPc suivie par une méthode de fluorescence (méthode HTRF). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la réponse de l'action de l'agoniste sur le récepteur.

### **1.1.3. Etude in vitro de l'effet benzo[a]pyrène sur l'activité des récepteurs $\beta_3$**

Même protocole que précédemment sauf que le récepteur est le récepteur endogène non peptidique (réf SK N MC cells) utilisé au 1 : l'isoprotérénol stimulant est à la concentration de 5  $\mu$ M ; l'incubation est réalisée à 22°C pendant 10 min seulement.

## **1.2. Méthodes**

Les dosages ont été effectués par la procédure standard à CEREP (Celle L'Escevault, France), en utilisant des cellules embryonnaires de rein (HEK-293 cellules) pour les récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques humains ayant une affinité avec l'aténolol comme un ligand de référence, ou des cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO cellules) ayant une affinité  $\beta_2$ -adrénergiques humains avec ICI 118551 comme un ligand de référence, ou de cellules SK-N-MC pour les récepteurs  $\beta_3$ -adrénergiques humains ayant une affinité avec cyanopindolol comme un ligand de référence (Levin et *al.*, 2002, Joseph et *al.*, 2004; Curran et Fishman, 1996). Les analyses de liaison avec le BaP ont été réalisées à l'aide de [3H] (-) CGP 12177 à 0,15 nM comme un agoniste sur les récepteurs adrénergiques  $\beta_1$  radioligand et  $\beta_2$  et en utilisant le [125I] CYP (+ 1  $\mu$ M (-) propranolol) à 0,2 nM comme un antagoniste radioligand sur les récepteurs adrénergiques  $\beta_3$ .

La liaison non spécifique a été déterminée en présence de différentes quantités de ligands non marqués non-spécifiques, selon le récepteur (tous au-delà): 50  $\mu$ M d'alprénolol pour les analyses de liaison sur les récepteurs adrénergiques  $\beta_1$  et  $\beta_2$ , ou 1 mM (-) pour les tests de liaison du propranolol sur les récepteurs adrénergiques  $\beta_3$ . Les aliquotes de préparation des cellules des membranes ont été incubés pendant 60 min à 22 ° C ( $\beta_1$ ), 120 min à 22 ° C ( $\beta_2$ ) ou 90 min à 37°C ( $\beta_3$ ). Après incubation, les échantillons ont été rapidement filtrés sous vide à travers un filtre en fibre de verre (Wallac Filtermat A) et rincés 3 fois avec le tampon glacé en utilisant une TomTec pour la récupération des cellules.

La liaison radioactive a été mesurée avec un compteur à scintillation (Betaplate, Wallac) en utilisant un scintillant solide (MeltiLex B / HS, Wallac). Les fortes concentrations testées en double avec les récepteurs  $\beta 1$  et  $\beta 2$  adrénergiques sont  $10^{-8}$  et  $10^{-5}$  M.

Les fortes concentrations testés en double avec les récepteurs adrénergiques  $\beta 3$  sont  $10^{-10}$  et  $10^{-8}$  M. Dans les expériences sur les récepteurs adrénergiques  $\beta 1$  et  $\beta 2$ , la référence respectifs des composés ont été testés à huit concentrations en double exemplaire, afin de vérifier que la concurrence résultant des courbes de liaison étaient conformes aux «courbes historiques» et celle qui correspond aux valeurs de IC50 ; les coefficients de Hill et Ki-valeurs (voir ci-dessous) étaient conformes aux valeurs classiques réalisés au CEREP.

### **1.2.1. Test de fonctionnalité des récepteurs $\beta 1$ adrénergiques humains en présence de benzo[a]pyrène**

Le test a été effectué conformément à la procédure standard à CEREP (Celle L'Escevault, France), en utilisant des cellules humaines embryonnaires de rein (cellules HEK-293) avec les récepteurs  $\beta 1$ -adrénergiques humains. L'aténolol a été testé à huit concentrations différentes comme un composé antagoniste de référence en même temps que le benzo [a] pyrène, afin d'évaluer la pertinence de dosage (détermination IC50) et les données ont été comparées avec les valeurs historiques déterminées au CEREP.

En bref, le test a été effectué comme suit: Préparation des cellules : temps d'incubation = 30 min, T°C d'incubation = 22°C.

### **1.2.2. Détermination de 100% de production d'AMPc en présence de stimulus 1nm d'isoprotérénol**

- Le mélange avec de fortes concentrations d'aténolol pour générer une courbe d'inhibition de référence (désintégration de l'AMPc) avec une IC50 et les valeurs  $k_o$  à comparer avec les valeurs historiques de CEREP.
- Mélange avec huit concentrations en double exemplaire de benzo[a]pyrène, pour vérifier si le côté pourrait entraîner une dégradation de la production d'AMPc.
- Mesure du taux d'AMPc par HTRF.

### **1.2.3. Analyse et expression des résultats**

Le ligand de liaison spécifique aux récepteurs est défini comme la différence entre la liaison totale (sans ligand non marqué) et la liaison non spécifique déterminée en présence d'un excès

de ligand non marqué. Les résultats sont exprimés en pour cent de contrôle de liaison spécifique ((mesurée liaison spécifique / de contrôle de liaison spécifique) \* 100) et une inhibition pour cent de contrôle de liaison spécifique (100 - ((mesurée liaison spécifique) / contrôle de la liaison spécifique) \* 100)) obtenus en présence de benzo (a) pyrène.

En ce qui concerne les analyses de liaison, lorsque cela est possible, les valeurs IC50 (concentration provoquant une inhibition de la demi-maximale de contrôle de liaison spécifique) et les coefficients de Hill (NH) ont été déterminés par analyse de régression non linéaire de la compétition des courbes générées c'est-à-dire de reproduire les valeurs en utilisant l'ajustement de courbe de l'équation ( $Y = + D [(AD) / (1 + (C/C50) * NH)]$ ), où Y = liaison spécifique, D = minimum de liaison spécifique, A = maximum de liaison spécifique, la concentration C = composé, C50 = facteur de pente IC50, et NH =). Cette analyse a été effectuée en utilisant un logiciel développé au CEREP (logiciel Hill) et validé par comparaison avec les données générées par 1997 par© 4.0 pour Windows (® les logiciels commerciaux SigmaPlot SPSS Inc.) La constante d'inhibition (Ki) ont été calculés en utilisant l'équation Cheng Prusof ( $Ki = IC50 / (1 + (L / KD))$ ), où la concentration de radioligand L = dans le test, et KD = affinité des radioligands pour le récepteur.

En ce qui concerne le dosage fonctionnel cellulaire sur les récepteurs  $\beta$ 1-adrénergiques humains, lorsque cela est possible, les valeurs IC50 (concentration provoquant une inhibition maximale de la demi-agoniste de la réponse spécifique de contrôle) ont également été déterminée en utilisant l'équation de Hill. La constante de dissociation apparente (ko) ont été calculés selon la méthode modifiée Cheng Prusof : l'équation ( $KB = IC50 / (1 + A/EC50A)$ ), où A = concentration de l'agoniste de référence dans le dosage, et la valeur EC50A (CE50) = l'agoniste de référence.

### 1.3. Résultats et discussion

Le tableau 8 montre la liste des paramètres de l'équation Hill, IC50, ki et NH, obtenus avec chaque composé de référence sur son récepteur  $\beta$ -adrénergique correspondante. Ces paramètres ont été considérés comme pertinents par rapport aux valeurs observées classiquement au CEREP, garantissant ainsi que les expériences de liaison qui ont été effectuées dans des conditions appropriées.

Selon le tableau 9, les analyses de liaison révèlent que le benzo[a]pyrène ne lie pas le  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3 adrénergiques, humains. La moyenne (%) de l'activité spécifique de contrôle (n = 2) reste égal à 100% de l'activité spécifique de contrôle, quelle que soit le benzo (a) pyrène testé.

Par conséquent, l'hypothèse selon laquelle l'inhibition de la lipolyse peut être due à une compétition entre le benzo[a]pyrène et  $\beta$ -agonistes, tels que les catécholamines pour lier le  $\beta$ -adrénergiques ne semble pas être pertinente. Cette observation tend à renforcer l'hypothèse selon laquelle le benzo[a]pyrène induirait une inhibition de la lipolysis par l'accumulation au niveau de la bicouche de phospholipides et des changements de conformation de la bicouche de phospholipides dans les environs des récepteurs transmembranaires à sept qui sont  $\beta$ -adrénergiques. Pour tester cette hypothèse, un test fonctionnel a été réalisé sur des récepteurs  $\beta$ 1-adrénergiques humains des cellules HEK-293. Ce test a consisté à mesurer le niveau d'AMPC produit en présence de benzo diverses [a]pyrène en utilisant l'agoniste de contrôle isoprotérénol à 1 nM pour générer un contrôle à 100% AMPC production.

Le tableau 10 tend à révéler une légère décroissance de production d'AMPC, indépendamment de la teneur en concentration de benzo[a]pyrène. Plus de 16 AMPC mesurés, 11 ont été jugés en dessous de 100%, 3 égal à 100% et 2 ci-dessus 100% de la production d'AMPC contrôle réalisés sans le benzo[a]pyrène. Ces résultats sont en conformité avec une perturbation du bon fonctionnement de la  $\beta$ 1-adrénergiques en présence de benzo[a]pyrène, en raison de benzo[a]pyrène induit des changements conformationnels de la bicouche de phospholipides dans les environs du récepteur.

Cette dernière observation a motivé une enquête fine de la bioaccumulation des HAP au niveau des bicouches phospholipidiques.

**Tableau 8 :** Paramètres de l'équation de Hill obtenus avec chaque composé de référence sur son récepteur adrénergique  $\beta$  correspondant (données validées par CEREP).

Récepteurs adrénergiques	Composés de reference testés	IC <sub>50</sub> (M)	K <sub>i</sub> (M)	n <sub>H</sub>
$\beta$ 1	Atenolol	5.9E-07	4.3E-07	1.1
$\beta$ 2	ICI 118551	1.4E-09	6.1E-10	1.4
$\beta$ 3	Cyanopindolol	2.2E-08	1.6E-08	0.5

Selon le tableau 8, les analyses de liaison révèlent que le benzo[a]pyrène ne lient pas le  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3 adrénergiques humains. Le pourcentage (%) en moyenne de l'activité spécifique de contrôle (n = 2) reste égal à 100% de l'activité spécifique de contrôle, quelle que soit le benzo (a) pyrène testé. Par conséquent, l'hypothèse selon laquelle l'inhibition de la lipolyse peut être due à une compétition entre le benzo[a]pyrène et  $\beta$ -agonistes, tels que les catécholamines pour

lier le  $\beta$ -adrénergiques ne semble pas être pertinente. Cette observation tend à renforcer l'hypothèse selon laquelle le benzo[a]pyrène induirait une inhibition de la lipolyse par l'accumulation au niveau de la bicouche de phospholipides et des changements de conformation de la bicouche de phospholipides dans les environs des récepteurs transmembranaires à sept qui sont  $\beta$ -adrénergiques. Pour tester cette hypothèse, un test fonctionnel a été réalisé sur cellules HEK-293 avec l'homme  $\beta$ 1-adrénergiques. Ce test a consisté à mesurer le niveau d'AMPC produit en présence de diverses concentrations de benzo[a]pyrène en utilisant isoprotérénol à 1 nM comme agoniste de contrôle pour générer un contrôle à 100% de production d'AMPC.

**Le tableau 10 tend à révéler une légère décroissance de production d'AMPC,** indépendamment de la teneur de la concentration en benzo[a]pyrène. Plus de 16 AMPC mesurés, 11 ont été jugés en dessous de 100%, 3 égal à 100% et 2 ci-dessus 100% de la production d'AMPC. Contrôle réalisé sans le benzo[a]pyrène. Ces résultats sont en conformité avec une perturbation du bon fonctionnement de la  $\beta$ 1-adrénergiques en présence de benzo[a]pyrène, en raison que le benzo[a]pyrène induit des changements conformationnels de la bicouche de phospholipides dans les environs du récepteur.

Cette dernière observation a motivé une enquête fine de la bioaccumulation des HAP au niveau des bicouches phospholipidiques.

**Tableau 9 :** Pourcentage (%) moyen de contrôle de liaison spécifique et (%) d'inhibition de contrôle contraignant réalisé en présence de benzo (a) pyrène (n = 2).

Récepteurs adrénergiques	Type de radioligand (test)	Concentration de benzo(a)pyrène testée (M)	Moyenne (%) de contrôle de liaison spécifique	Moyenne (%) de contrôle d'inhibition spécifique	Liaison du benzo(a)pyrène au récepteur adrénergique
$\beta$ 1	Agonist	1.0E-08	99.5±2.8	0.5±2.8	Non
$\beta$ 1	Agonist	1.0E-05	98.6±4.6	1.4±4.6	Non
$\beta$ 2	Agonist	1.0E-08	101.1±8.6	-1.1±8.6	Non
$\beta$ 2	Agonist	1.0E-05	96.4±5.9	3.4±5.9	Non
$\beta$ 3	Antagonist	1.0E-10	122.4±4.9	-22.0±4.9	Non
$\beta$ 3	Antagonist	1.0E-08	114.4±10.1	-14±10.1	Non

**Tableau 10** : Test de fonctionnalité du récepteur  $\beta 1$  en présence de benzo[a]pyrène comme antagoniste potentiel

Concentration (M) de benzo(a)pyrène testée	Réponse agoniste (% par rapport à la mesure de contrôle)
1.0E-10	99.8±0.0
1.0E-09	89.5±0.7
1.0E-08	92.2±0.0
3.0E-08	100±0.0
1.0E-07	96.5±4.9
1.0E-06	104.9±21.2
3.0E-06	94.7±3.5
1.0E-05	99.8±2.1

Le contrôle de liaison spécifique a été déterminée à l'aide de l'alprénolol (50  $\mu\text{M}$ ) pour les deux récepteurs  $\beta 1$  et  $\beta 2$ -adrénergiques et de l'utilisation de (-) propranolol (1mM).

Isoprotérénol à 1 nM a été utilisé comme un agoniste de contrôle pour générer un contrôle à 100% de production AMPc.

## 2. Conclusion

Par rapport à l'hypothèse de départ, les résultats exprimés dans cette note apportent la preuve que l'effet des polluants sur les mécanismes lipolytiques ne doit pas être recherché sur l'action directe du polluant sur la réactivité du récepteur par rapport à son ligand.

Il reste une autre hypothèse à tester par le travail Jimenez *et al.*, 2002.

L'accumulation des polluants de type hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) est généralement recherchée dans la vésicule lipidique, eu égard à la lipophilie de ces substances aromatiques. Pourtant, travaillant avec des méthodes de microscopie de fluorescence, Jimenez a montré que ces polluants pouvaient être retrouvés dans la membrane de l'adipocyte et en particulier dans la bicouche phospholipidique de cette membrane : il s'en suit une perturbation de l'environnement de cette membrane. Nous pouvons postuler que l'une de ces perturbations touche la partie transmembranaire du récepteur, modifiant ainsi son activité.

Comme indiqués sur les tableaux 9 et 10, l'addition de BaP à des concentrations de  $10^{-10}$  et de  $10^{-8}$  M ne provoque aucune inhibition de «binding» (liaison) de contrôle. Le BaP ne semble pas se fixer directement au récepteur adrénergique.

De même comme cela apparaît à l'évidence sur le tableau 10, la présence dans le milieu du BaP ne semble pas perturber dans les conditions opératoires utilisées, le fonctionnement biologique du récepteur vis-à-vis de son agoniste : un résultat identique a été obtenu aussi bien pour le récepteur  $\beta_1$  que pour le récepteur  $\beta_3$ , c'est-à-dire pour le récepteur de l'adrénaline que pour celui d'un agoniste tel que BRL37344.

## **Partie 3**

### **Effet membranaire**

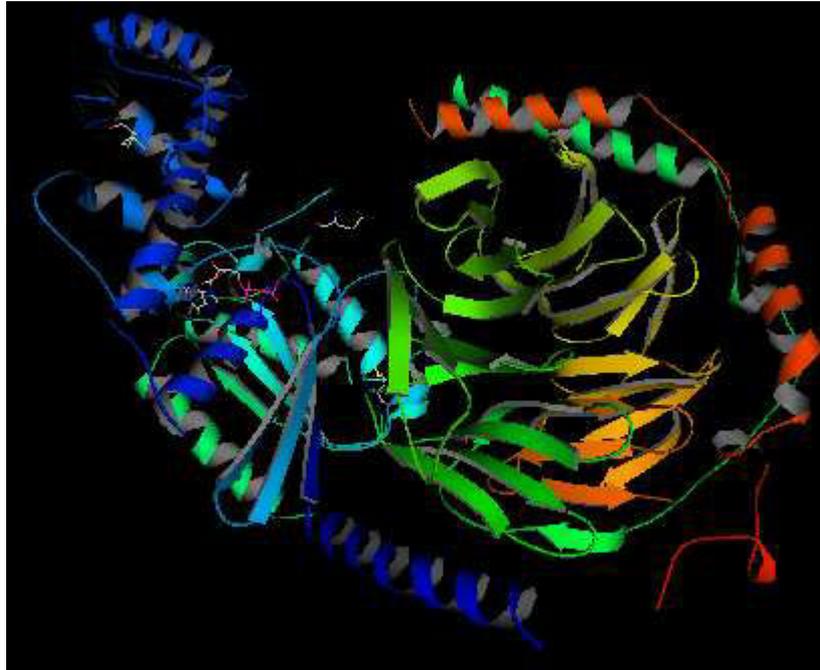
#### **A. La membrane biologique**

##### **1. Structure et composition de la membrane biologique**

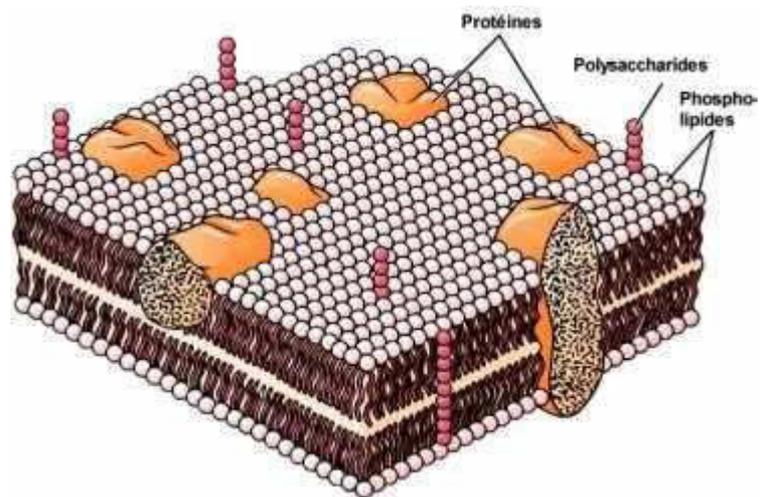
En biologie cellulaire, la membrane désigne un assemblage de molécules en un double feuillet séparant la cellule de son environnement et délimitant les organelles à l'intérieur de celle-ci (Berkaloff et *al.*, 1977 ; Alberts et *al.*, 1989 ; Bretscher et *al.*, 1985 ; Maillet 1992 ; Maillet, 2002). La membrane est un ensemble complexe de lipides, de protéines et de sucres (Figure X) régulant les échanges de matière entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule ou entre deux compartiments cellulaires par des transporteurs, bourgeonnement de vésicules, phagocytose, *etc.* Les composants-clé de la membrane biologique sont les phospholipides (Azerad et *al.*, 1974 ; Chapman et *al.*, 1982 ; Marsh et *al.* 1983). Ils ont la capacité de s'auto-organiser en un double feuillet, leurs têtes hydrophiles pointant vers l'extérieur et leurs chaînes hydrophobes pointant vers l'intérieur (Voet et *al.*, 1998).

Les protéines membranaires assurent les processus dynamiques liés aux membranes et on ne trouve donc de protéines spécifiques que dans des membranes spéciales (Maillet, 1992). Les rapports protéine/lipides des membranes varient considérablement selon la fonction membranaire, bien que la plupart des membranes aient au moins 50% de protéines (Maillet, 1992 ; Maillet, 2002 ; Pollard et *al.*, 2004).

Une membrane est composée d'une bicouche de lipides (des phospholipides dans la plupart des cas) (Figures 14), chaque lipide ayant sa tête hydrophile (phosphates chargés négativement) orientée vers l'extérieur de la membrane et sa queue hydrophobe (chaîne grasse) orientée vers l'intérieur (Dawidowicz et *al.*, 1987 ; Lemmon et *al.*, 1987 ; Cowan, 1993). Son épaisseur est d'environ 7,5 nm. La membrane cytoplasmique est qualifiée de "dynamique" de par son constant renouvellement (Singer et *al.*, 1972 ; Schechter, 1984 ; 1993).



**Figure 13** : Structure de la protéine G



**Figure 14** : La membrane des cellules est formée d'une double couche de phospholipides. On y retrouve aussi des protéines et des polysaccharides (Maillet, 1992 ; Voet et *al.*, 1998 ; Pollard, 2004).

## **2. Membrane et phase de la matière**

La membrane peut adopter différents états en fonction de la température et de la pression. Par exemple, une membrane de phospholipides purs forme une phase liquide-cristalline à 20°C et 1 bar de pression tandis qu'à -20°C elle forme plutôt une phase gel. Les mouvements latéraux sont très faciles mais les mouvements (flip-flop) d'un côté à l'autre sont rares (Schechter 1984 ; 1993 ; Maillet, 1992 ; Doolittle 1998 ; Kuman *et al.*, 1998).

## **3. Membrane et tension de surface**

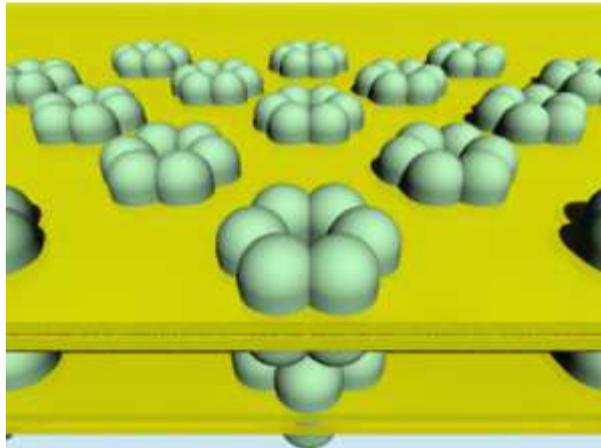
Globalement, la tension superficielle d'une membrane biologique est nulle. En revanche, cette tension peut être localement non nulle (Schechter, 1984). D'une part, les têtes polaires des lipides, peu fluides, ont tendance à se compacter en créant localement un pic négatif de tension. D'autre part, les queues hydrophobes, très fluides, ont tendance à occuper beaucoup d'espace, créant localement un pic de tension positif. Les pics de tension positif et négatif s'équilibrant, la tension superficielle globale reste nulle (Pollard *et al.*, 2000).

## **4. Propriétés des membranes**

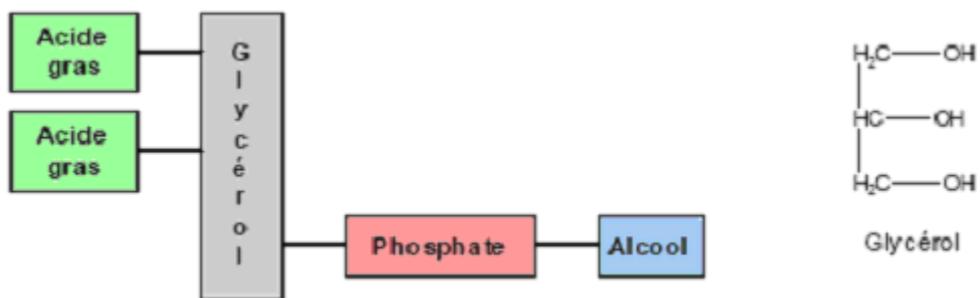
### **4.1. Perméabilité membranaire**

En premier lieu, les membranes biologiques constituent une barrière sélective entre l'intérieur et l'extérieur d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire (organite). Elles présentent donc la propriété de perméabilité sélective, qui permet de contrôler l'entrée et la sortie des différentes molécules et ions entre le milieu extérieur et celui intérieur (Voet *et al.*, 1998). Cela permet à chaque organite cellulaire, mais également à la cellule tout entière d'avoir une composition propre différente de celle extérieure (Chapman *et al.*, 1982 ; Maillet, 2002).

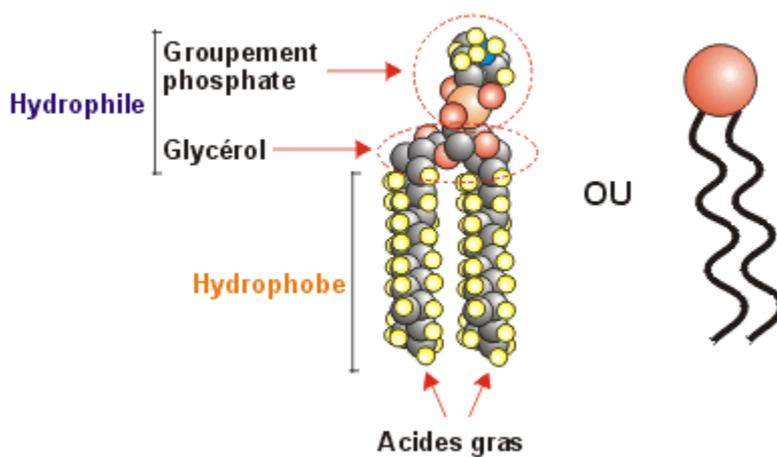
En elles-mêmes, les membranes ne sont perméables qu'aux petites molécules hydrophobes (O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, glycérol, etc.), par diffusion simple. Mais elles servent de support à de nombreuses protéines transmembranaires ayant pour rôle de réguler les échanges transmembranaires (ex : canaux ioniques) pour les transferts d'ions, aquaporines pour le transfert d'eau par osmose, etc.). Il est possible de distinguer différents types de transfert de petites molécules (masses moléculaires inférieures à environ 500-700 unités de masse atomique à travers la membrane (Berg, *et al.*, 1985).



**Figure 16** : Canal ionique : Reconstitution tridimensionnelle par ordinateur de l'aspect des jonctions communicantes (image de synthèse) (Wikipedia, 2006).



**Figure 17** : Structure chimique d'un phospholipide



**Figure 18** : Schéma d'un phospholipide

**4.2. Le transport passif** : transport de composés sans consommation d'énergie (le long du gradient électrochimique). Il existe 2 sortes de transport passif :

- **la diffusion simple** : diffusion de composés directement à travers la bicouche lipidique
- **la diffusion facilitée** : transport de composés à travers la bicouche lipidique grâce à une protéine de transport

**4.3. Le transport actif** : transport de composés à travers la bicouche lipidique grâce à une protéine de transport et une consommation d'énergie sous forme d'ATP (contre le gradient électrochimique).

Le transport à travers les membranes de molécules plus grosses se fait par endocytose (vers l'intérieur) et exocytose (vers l'extérieur) (Kaback, 1992 ; Kramer, 1994).

Plus généralement, la membrane sert de barrière sélective à l'information biologique. Cette information prend la forme d'une hormone, d'un sucre, d'une protéine, etc. Elle est captée par des récepteurs membranaires, des protéines capables de reconnaître spécifiquement un composé. Cette reconnaissance enclenche un mécanisme de signalisation cellulaire aboutissant à une réaction de la cellule face au signal qu'elle a reçu (Pollard et *al.*, 2004).

#### **4.4. Capacité à se sceller**

Les membranes ont la capacité de fusionner et de se séparer. Ce mécanisme est prépondérant dans les phénomènes d'exocytose et d'endocytose (Maillet et *al.*, 2002).

### **5. Canal ionique**

Un canal ionique est une catégorie de protéines membranaires perméables à un ou plusieurs ions (Agre et *al.*, 1998 ; Catterall, 1994 ; Cooper et *al.*, 1999). Il existe de nombreux types de canaux ioniques. Ils peuvent être sélectivement perméables à un ion tel que le sodium (Na), le calcium (Ca), le potassium (K) ou le chlore (Cl), ou bien à plusieurs ions à la fois. De façon générale, un canal est sélectivement perméable à une espèce ionique. Les canaux ioniques (Figure 16) sont présents dans la membrane de toutes les cellules. Ils ont en particulier un rôle central dans la physiologie des cellules excitables comme les neurones (Dutzler et *al.*, 2002) . Les canaux facilitent la diffusion, dans le sens où ils n'influent pas sur le sens de passage des ions, uniquement dicté par la différence de potentiel électrochimique de l'ion considéré (somme de la différence de concentration et du champ électrique). Un canal ne peut pas

transporter un ion contre ce gradient. Ce rôle est tenu par des pompes membranaires, comme la pompe sodium/potassium (Voet et *al.*, 1998), qui doivent utiliser de l'énergie à cette fin (Pollard, 2004).

On distingue plusieurs types de canaux ioniques selon le stimulus gouvernant leur ouverture.

Deux groupes sont majoritaires :

- **voltage-dépendants** ou tensiodépendant : leur ouverture dépend de la modification de la polarité membranaire (ex : canaux à sodium mis en jeu pour la propagation d'un potentiel d'action) (Amstrong et *al.*, 1998).
- **chimio-dépendant** : il s'agit de la classe des récepteurs ionotropes, dont les membres s'ouvrent en présence d'un ligand. Ces canaux participent à la construction de la synapse chimique.

Il existe des canaux activés par d'autres stimuli, tels que le froid, la chaleur, l'étirement de la membrane, le volume cellulaire etc.

Enfin, il faut signaler l'existence d'une classe particulière de canaux ioniques : les connexines des jonctions communicantes. Ces canaux font communiquer une cellule avec une autre, alors que les canaux ioniques classiques font communiquer la cellule avec son extérieur (Catterall et *al.*, 1994 ; Pollard, 2004) .

### ***5.1. Propriétés des canaux ioniques***

Les canaux constituent la famille de molécules de transporteurs transmembranaires la plus représentée dans la cellule. Le principe est simple, quand le canal est fermé, il est totalement étanche, quand il est ouvert, sa molécule spécifique le traverse selon son gradient électrochimique (Schechter, 1984 ; 1993 ; Maillet et *al.*, 2002). Si ce gradient s'annule, le mouvement transmembranaire s'arrête, s'il s'inverse le mouvement s'inverse également. Les canaux ne peuvent en aucun cas effectuer des transports contre le gradient électrochimique et sont donc responsables de la diffusion facilitée. Ils ne font qu'accélérer un mouvement qui se produirait en leur absence mais à une vitesse beaucoup trop lente (Stein, 1981).

Les canaux sont très sélectifs de la molécule qui les traverse, bien que cette sélectivité soit variable selon la famille de canal. Le moins sélectif, comme le canal nicotinique impliqué dans la stimulation de la contraction musculaire, laisse passer tous les ions positifs monovalents. A l'autre bout de la chaîne, certains canaux, les plus nombreux, ne laissent passer qu'un seul ion ou molécule : calcium, sodium, chlore, eau (Aquaporines) (Agre, 1998 ; Maillet, 2002 ; Pollard, 2004).

Toutefois, ce qui fait la grande diversité des canaux n'est pas tant les molécules qui les traversent que leurs modalités d'ouverture. Certains sont ouverts en permanence. D'autres s'ouvrent sous l'action d'une molécule ou d'un ion. D'autres, enfin, s'ouvrent sous une action mécanique, une variation de potentiel, une variation de température. La durée d'ouverture aussi varie. Les canaux peuvent rester ouverts tant que le stimulus est présent, d'autres se referment après quelques millisecondes et sont parfois suivis d'une période réfractaire pendant laquelle une nouvelle stimulation n'ouvrira pas le canal. Les canaux sont alors dit désensibilisés.

## **5.2. Rôles physiologiques**

Les canaux sont impliqués dans de nombreux phénomènes cellulaires. Ils sont responsables d'une propriété universelle aux membranes cellulaires : l'existence d'un potentiel transmembranaire. Ils ne sont en général pas responsables de la régulation de la composition cellulaire. Ils participent aussi au phénomène d'excitabilité cellulaire. Les dépolarisations et mouvements ioniques qu'ils provoquent assurent des phénomènes tels que l'initiation et la propagation du potentiel d'action, la contraction cellulaire, la sensibilité de certains récepteurs sensoriels, mais aussi la sensibilité aux hormones et aux neurotransmetteurs. Ces rôles variés sont le résultat d'un nombre élevé de types de canaux. Pour le calcium, par exemple, il n'existe en effet pas un seul canal dans l'organisme, mais plus d'une dizaine se différenciant par leur mode d'ouverture, leur durée d'ouverture et leur régulation, et c'est le cas de tous les canaux. De fait, le blocage des canaux peut avoir des conséquences très graves pour l'organisme, et les toxines les plus mortelles agissent en général sur eux (Voet et *al.*, 1998 ; Cooper et *al.*, 1999).

## **5.3. Diversités moléculaires des canaux ioniques**

Plusieurs familles de protéines, elles-mêmes codées par plusieurs familles de gènes, sont capables de former des canaux ioniques. Elles sont toutes caractérisées par plusieurs segments transmembranaires qui s'organisent en pore (North, 1996 ; Sukharev, 1997).

- Les protéines de la superfamille des canaux potassiques se composent de quatre domaines ou sous-unités de six segments transmembranaires (Figure 16). Chaque domaine possède de surcroît une région P, qui participe à la formation du pore. Le quatrième segment transmembranaire est responsable de la sensibilité au potentiel de membrane. Des domaines aux extrémités C-terminal ou N-terminal permettent la liaison et la modulation du canal par des composés intracellulaires.

#### 5.4. *Biophysique des canaux ioniques*

Les canaux ioniques sont des protéines intégrales de membrane permettant le passage d'ions, molécules et atomes chargés, à travers la bicouche lipidique, laquelle est strictement imperméable aux molécules chargées. L'espèce diffuse selon son gradient électrochimique.

Autrement dit, les canaux sont une voie de passage passive. Ce passage d'ion constitue par définition un courant électrique. En plaçant deux électrodes de part et d'autre de la membrane, il est possible de suivre très précisément le passage des ions par la mesure du courant électrique associé. La vitesse de passage des ions est très élevée, de l'ordre de  $10^7$  à  $10^8$  ions par secondes (Voet et *al.*, 1998).

Les canaux ioniques présentent deux propriétés biophysiques fondamentales :

- Ils sont sélectifs. Seule une espèce ionique en général est perméable à travers le pore aqueux traversant la bicouche lipidique.
- Ils sont perméables selon la loi du *tout ou rien* car ils n'existent que sous deux états, ouvert ou fermé, quel que soit le stimulus d'ouverture. Cette propriété aura d'importantes conséquences lors de la description cinétique des canaux.

### 6. **Transduction du signal**

Les mécanismes d'ouverture du canal sont divers. Chaque mécanisme possède ses propres caractéristiques, mais tous ont ceci en commun que le signal doit être, d'une manière ou d'une autre, couplé à la porte.

Notez que la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase est décrite depuis récemment comme un canal à deux portes s'opposant au passage ionique. Peut-être en est-il ainsi de tous les transporteurs ? Les canaux n'ayant eux qu'une seule porte. Notons toutefois l'existence de désensibilisation pouvant faire intervenir une porte supplémentaire et distincte (Maillet, 2002 ; Pollard, 2004).

#### 6.1. **Stimulus d'ouvertures**

- canaux activés pour certaines valeurs du voltage transmembranaire (canal tensiodépendant)
- liaison d'un ligand extracellulaire (récepteur ionotrope)
  1. canaux activés par le volume cellulaire
  2. canaux activés par la tension ou le degré d'étirement de membrane
- messenger secondaire extracellulaire
  1. calcium

2. AMPc
3. GMPc

## **6.2. Messenger secondaire**

Les messagers secondaires, ou seconds messagers sont des molécules permettant la transduction d'un signal provenant de l'extérieur d'une cellule, vers l'intérieur ou la surface de celle-ci. Généralement un ligand (une hormone) se lie à un récepteur membranaire. Cette liaison est à l'origine de la libération d'un messenger secondaire dans le cytoplasme, ou dans la membrane plasmique selon l'affinité chimique (hydrophile/hydrophobe) de celui-ci. Ce messenger secondaire peut entraîner une cascade de réactions (ce qui amplifie le signal) débouchant sur une réponse cellulaire (transcription de gène-cible, libération du contenu de vésicules d'exocytose, etc.) (Berridge et *al.*, 1998 ; Voet et *al.*, 1998)

### **6.2.1. Définition de second messenger**

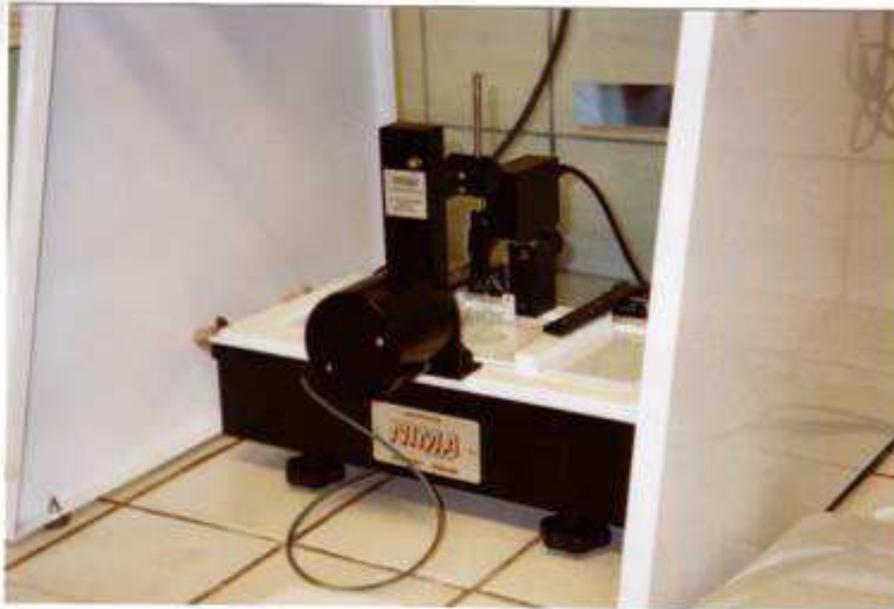
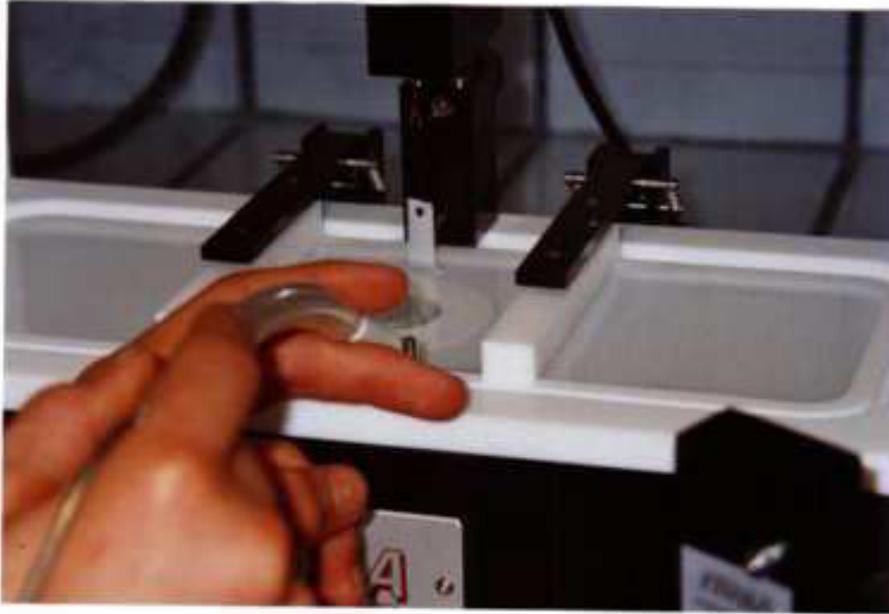
Le second messenger doit présenter un certain nombre de propriétés pour être considéré comme tel :

1. Il doit présenter une élévation temporaire de sa concentration due à la présence du premier messenger (le ligand)
2. Il doit précéder l'effet biologique
3. On doit pouvoir reproduire l'action du premier messenger en augmentant expérimentalement la concentration du second messenger

Les relais les deux messagers se fait via une protéine G.

### **6.2.2. Voies faisant intervenir l'AMPc (Adénosine Monophosphate Cyclique)**

L'AMPc ou second messenger, est le médiateur d'une grande variété de réponses cellulaires par activation de la Protéine Kinase A (PKA) qui modifient l'activité de nombreuses protéines cellulaires par phosphorylation (Langin et *al.*, 2000).



**Figure 19** : Dispositif pour réaliser les monocouches de Langmuir.

### 6.2.2.1. L'action du glucagon

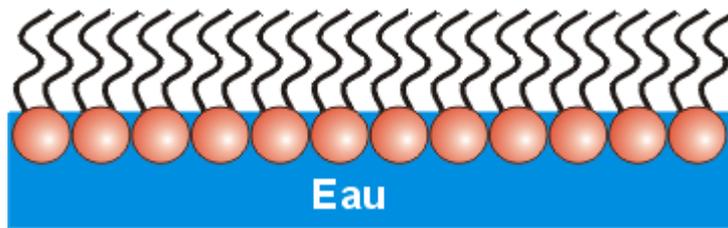
- Il y a fixation du glucagon ou d'adrénaline sur le récepteur spécifique de la cellule hépatique (Voet et *al.*, 1998 ; Whitehead et *al.*, 2000 ; Stock et *al.*, 2000)
- L'occupation du récepteur favorise le remplacement d'un GDP lié à la protéine G (ici G stimulatrice Gs) du GDP par un GTP activant ainsi Gs
- La sous unité alpha liée au GTP se déplace vers l'adénylate cyclase (AC) et l'active
- L'adénylate cyclase (AC) catalyse la formation de l'AMPc à partir d'ATP
- L'AMPc active la protéine kinase AMPc dépendante (PKA)
- Les PKA activent à leur tour des phosphorylases kinases
- Celles-ci vont elles même activer des Glycogènes phosphorylases kinases qui réduisent le glycogène en glucose-1-phosphate
- La phosphodiesterase de l'AMPc dégrade l'AMPc, arrêtant l'activation de la PKA

### 6.2.2.2. Différentes actions des protéines kinases A (PKA)

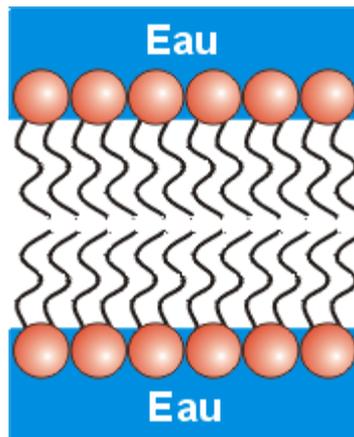
- Assemblage, désassemblage des microtubules du cytoplasme
- Synthèse protéique dans le réticulum endoplasmique granuleux (REG)
- Synthèse d'ADN, d'ARN, différenciation dans le noyau
- Active des glycogènes synthétases : production de glycogènes
- Active des triglycérides lipases : production de lipides (Maillet, 2002 ; Pollard et *al.*, 2004).

### 6.2.2.3. Cas du récepteur $\beta$ -adrénergique des cellules du tissu nodal du cœur

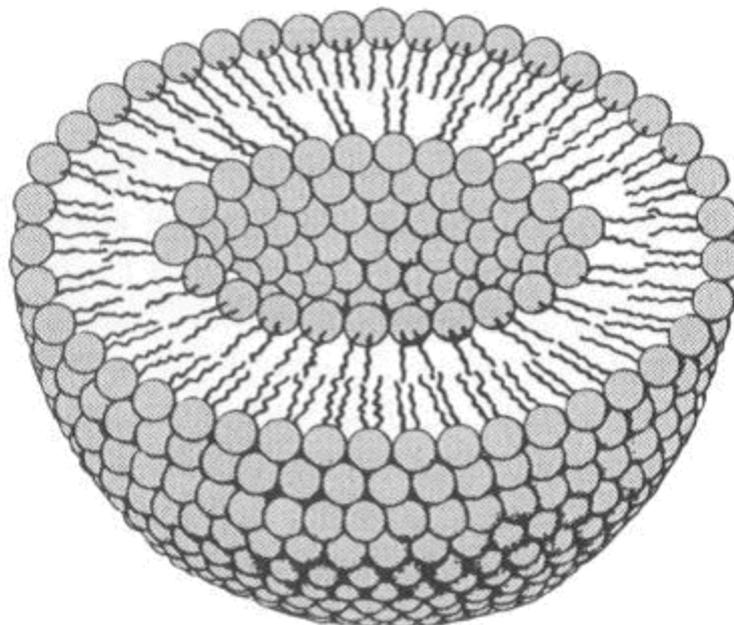
- La (nor)adrénaline se fixe sur le récepteur  $\beta$ -adrénergique (Pollard et *al.*, 2004)
- Il y a clivage d'une protéine G qui active une adénylate cyclase (AC)
- Ceci entraîne une augmentation de la concentration en AMPc qui se fixe sur un canal à  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$
- Ceci provoque l'ouverture du canal, entraînant la dépolarisation de la membrane de la cellule nodale avec pour conséquence l'accélération du rythme cardiaque (Wikipedia, 2005).



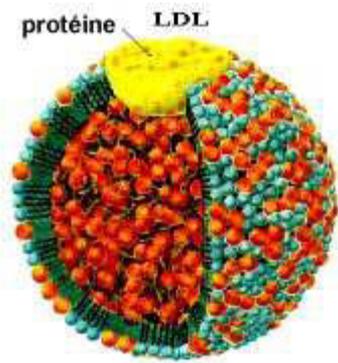
**Figure 20** : Monocouche phospholipidique



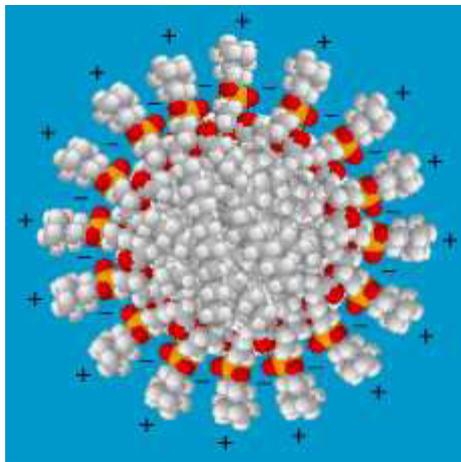
**Figure 21** : Double couche de molécules phospholipidiques



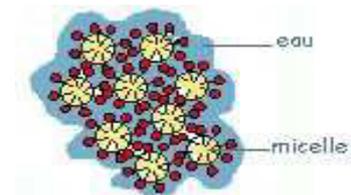
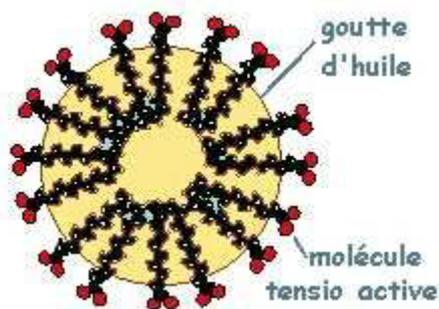
**Figure 22** : Liposome formé par les phospholipides (Hammond et *al.*, 1999)



**Figure 23** : Lipoprotéine de faible densité



**Figure 24** : Principe de formation d'une micelle  
(La couleur bleue symbolise l'eau)



**Figure 25** : Micelles de mayonnaise

### 3. Voie des phosphatidyl-inositols

- L'hormone se lie au récepteur spécifique (par exemple le récepteur  $\alpha_1$ -adrénergique) (Voet, 1998 ; Pollard, 2004)
- L'occupation du site provoque un échange GDP-GTP sur une protéine G
- La protéine G liée au GTP se déplace vers la phospholipase C (PLC), s'y lie et l'active
- La PLC activée scinde le PIP<sub>2</sub> (phosphatidyl-inositol-4-5 biphosphate) en IP<sub>3</sub> (inositol-triphosphate) et DAG (diacylglycérol)
- IP<sub>3</sub> se lie à un récepteur spécifique sur le réticulum endoplasmique (RE) libérant les ions Ca<sup>2+</sup> prisonniers dans le RE
- Le DAG et les ions Ca<sup>2+</sup> activent la protéine kinase C (PKC)
- Le Ca<sup>2+</sup> active la calmoduline
- Les PKC activées provoquent la phosphorylation de protéines cellulaires ce qui est responsable de la réponse cellulaire (Jones et *al.*, 1989 ; Maillet, 2002 ; Pollard, 2004)

### B. La membrane artificielle

Une grande partie des connaissances au niveau des membranes a été obtenue à partir de modèles membranaires biomimétiques variés allant des systèmes vésiculaires aux bicouches lipidiques (Mc Connell et *al.*, 1986). Ces derniers modèles devaient, de part leur robustesse, permettre l'utilisation de techniques sophistiquées pour des études structurales et dynamiques permettant ainsi de mieux comprendre les interactions protéines-lipides ou encore les fonctions membranaires (Knoll et *al.*, 2000). Une des stratégies consiste à ancrer la bicouche lipidique sur un lit continu ou discontinu de polymère (Sackman et *al.*, 1996 ; Richter et *al.*, 2003). Parmi les autres stratégies de reconstitutions possibles, la structure biomimétique développée dans certaines études, est fondée sur la formation de bicouches lipidiques décollées du support à l'intérieur d'un oxyde d'aluminium nanoporeux. Ce type de structure crée un compartiment entre le support et la bicouche de façon à faciliter l'insertion de protéines transmembranaires. Cette structure biomimétique est développée dans le but d'étudier les activités catalytiques des protéines de la chaîne respiratoire. En effet, la géométrie et la grande surface de bicouche du système peuvent être vues comme un modèle simplifié des membranes internes des chloroplastes ou des mitochondries.

#### 1. Les phospholipides (ou phosphoglycérolipides)

Les composants-clé de la membrane biologique sont les phospholipides. Ils ont la capacité de s'auto-organiser en un double feuillet, leurs têtes hydrophiles pointant vers l'extérieur et leurs chaînes hydrophobes pointant vers l'intérieur (Ratner et *al.*, 1987) .

Les phospholipides ressemblent aux triglycérides. Ils sont formés d'un glycérol lié à deux acides gras et à un groupement phosphate (Figures 17 ; 18). Les phospholipides diffèrent les uns des autres par la sorte d'acides gras rattachés au glycérol. Généralement, un des deux acides gras est saturé et l'autre ne l'est pas. Ils diffèrent aussi par différents groupements chimiques qui peuvent se rattacher au groupement phosphate. Un phospholipide est une molécule tensioactive (se dit d'une substance qui modifie la tension superficielle du liquide dans lequel elle est dissoute) qui entre dans la composition des membranes cellulaires.

### **1.1. Comportement face à l'eau**

La portion glycérol et phosphate de la molécule est dite **hydrophile** (*qui aime l'eau*) alors que les acides gras sont **hydrophobe** (*qui n'aime pas l'eau*). La partie hydrophile est soluble dans l'eau alors que la partie hydrophobe ne l'est pas (elle est soluble dans les lipides) (Ratner, et *al.*, 1987).

### **1.2. Formation d'une couche monomoléculaire**

Placées dans de l'eau, les molécules de phospholipides ont tendance à former une couche monomoléculaire (une molécule d'épaisseur) où seules les portions hydrophiles sont en contact avec l'eau (Figure 20). Si on "force" les phospholipides à se mélanger à l'eau, ils forment alors une double couche moléculaire : les acides gras hydrophobes se font face (ils ont plus d'affinité entre eux qu'avec les molécules d'eau) alors que les portions hydrophiles demeurent en contact avec l'eau) (Decher et *al.*, 1992). Il se forme ainsi une membrane de l'épaisseur des deux couches de molécules (Figures 14 et 21).

### **1.3. Formation d'une double couche de phospholipides**

La membrane des cellules est formée d'une double couche de phospholipides. On y retrouve aussi des protéines et des polysaccharides (Figure 14 et 21).

La portion hydrophile de la molécule a plus d'affinité avec l'eau qu'avec les acides gras. Les acides gras hydrophobes ont plus d'affinité entre eux ou avec des lipides qu'avec l'eau. Les phospholipides dans l'eau ont donc tendance à former une double couche moléculaire.

### **1.4. Formation de liposomes**

Mélangés à de l'eau, les phospholipides peuvent former de petites sphères microscopiques appelées liposomes (Bangham et *al.*, 1965). Chaque liposome est une petite sphère creuse délimitée par une double couche de phospholipides (Figure 22). Les phospholipides peuvent aussi former une simple couche enrobant de petites gouttelettes de lipides. Ces structures, appelées micelles, permettent aux lipides de demeurer en suspension dans l'eau. La portion hydrophobe des phospholipides est liée au gras alors que la portion hydrophile, dirigée vers l'extérieur, se lie à l'eau ce qui rend l'ensemble soluble dans l'eau (Figure 23 et 24).

### **1.5. Lipoprotéine de faible densité (LDL)**

Les LDL sont de petites sphères grasses permettant le transport du cholestérol dans le sang. Elles sont constituées de cholestérol enrobé d'une couche de phospholipides. De tels assemblages de lipides sont appelés micelles. Sur cette image, les phospholipides sont en vert et le cholestérol en orange. Le côté hydrophile des phospholipides est dirigé vers l'extérieur (ce qui permet à la micelle d'être soluble dans l'eau) alors que le côté hydrophobe est du côté du cholestérol. La portion jaune est une protéine qui permet à la micelle de se fusionner à une cellule. Les LDL contiennent aussi des triglycérides et des acides gras mélangés au cholestérol.

### **1.6. Formation de micelles ou des bicouches**

Les phospholipides peuvent former des micelles ou des bicouches (Figures 24 ; 25).

L'illustration montre une coupe médiane dans un modèle de micelle. La construction de la micelle fait appel à deux forces opposées :

- **une force d'attraction de type "hydrophobe"** entre les chaînes aliphatiques des acides gras (Schwinte et *al.*, 1981).
- **une force de répulsion de type électrostatique** entre les têtes hydrophiles hydratées, qui se disposent à l'extérieur de ce volume et assurent l'interface avec l'eau.

Donnons ici l'exemple de la mayonnaise qui est formée de micelles en suspension dans l'eau. (Figure 25).

### **1.7. L'effet hydrophobe**

Une molécule amphiphile placée dans l'eau en perturbe l'organisation tridimensionnelle et introduit un certain déséquilibre dans l'organisation du solvant. Il se produit alors deux phénomènes distincts :

\* une partie de la molécule est polaire, et les interactions qu'elle établit avec l'eau (liaisons H et/ou hydratation d'ions) concourent à un nouvel équilibre (cette partie est dissoute dans l'eau),

\* l'autre partie de la molécule est hydrophobe, et aucune nouvelle interaction avec l'eau ne permet de stabiliser le système.

L'eau forme alors une cage de solvation autour de cette autre partie. Une énergie potentielle est créée, d'autant plus grande que la surface de la cage est importante. Il en résulte une force qui tend à regrouper les structures hydrophobes dans une même région pour en minimiser la surface. C'est exactement ce qui se passe lorsqu'une suspension de gouttelettes d'huile dans l'eau (émulsion) est laissée à reposer. Les gouttelettes se déplacent spontanément (ce qui démontre bien qu'une force est en action), se regroupent progressivement (coalescence) de manière à ne plus former au bout d'un moment qu'une seule masse d'huile flottant à la surface de l'eau (phénomène de démixtion). C'est ce qu'on appelle l'effet hydrophobe. Finalement, la cage de solvation est réduite à l'interface entre les deux fluides, qui est la plus petite surface de contact possible.

### **1.8. Les interactions hydrophobes**

Dans l'eau, l'effet hydrophobe regroupe les structures hydrophobes et les maintient en contact. Ce contact est entretenu par des interactions plus ou moins durables entre les noyaux (+) et les électrons (-) d'atomes voisins. Parmi d'autres types d'interactions, les contacts de Van der Waals se reconnaissent facilement sur les modèles moléculaires par de simples contacts entre atomes. Les contacts (ou interactions) de Van der Waals sont fondamentalement des interactions électrostatiques. Cependant, compte tenu de leur fréquente participation à la stabilité des structures hydrophobes, ils peuvent être classés parmi les interactions hydrophobes (Schwinte et *al.*, 2002).

Les chaînes hydrophobes des acides gras se trouvent presque tout entières enfouies dans le volume intérieur de la micelle, qui peut être considéré comme un hydrocarbure liquide (une goutte d'huile). Des contacts de Van der Waals participent à la cohésion de la structure. Les ions phosphate et ammonium forment une couche hydrophile à la surface de la micelle, qui empêche l'eau d'entrer en contact avec les acides gras. Dans ces conditions, il n'y a pas de cage de solvation. Les micelles sont des édifices stables formés par les phospholipides en présence d'eau.

### **1.9. Principe de formation d'une bicouche**

L'illustration montre une coupe transversale dans un modèle de bicouche lipidique formant membrane entre deux couches de molécules d'eau. Les phospholipides y sont rangés parallèlement les uns aux autres en couches, et deux couches de phospholipides sont orientées tête-bêche. On reconnaît facilement les pôles hydrophiles par la coloration orange du phosphore. Encore une fois, les chaînes hydrophobes sont concentrées au milieu de la structure, et les têtes polaires aident à les isoler des molécules d'eau environnantes.

Cette structure illustre bien le rôle de barrière hydrophobe que constitue une membrane entre deux compartiments hydratés, comme par exemple le milieu extracellulaire et le cytoplasme.

La Figure 19 montre le dispositif pour réaliser les monocouches de Langmuir.

C'est un dispositif qui est composé d'une cuve principale en téflon peu profonde (environ 5mm). Au milieu se situe un puits de 36 mm de diamètre et 5 cm de profondeur dans lequel s'effectuera la synthèse de la couche. La couche comporte deux barrières en téflon qui permettent de réguler la surface occupée par la monocouche de phospholipides qui sera déposée.

### **1.10. Principe de la diffusion passive**

L'arrangement ordonné, bien parallèle, des phospholipides correspond en fait à des structures figées, comme le beurre dans le réfrigérateur. A température (physiologique) plus élevée, les phospholipides sont animés du même mouvement brownien que les molécules d'eau, ce qui rend la bicouche fluide. Du fait de ces mouvements, les phospholipides tendent à se déformer, à se regrouper ou au contraire à se séparer momentanément, et des molécules d'eau et des ions hydratés peuvent occasionnellement fuir par les brèches ainsi formées. Ces fuites rendent compte de la diffusion passive d'eau et de substances dissoutes au travers des membranes. Cependant, le phénomène est bien trop limité pour permettre des échanges efficaces et contrôlés entre les compartiments cellulaires.

C'est ici qu'interviennent les protéines. Il existe de nombreux types de protéines membranaires dont les rôles peuvent être très différents. Certaines de ces protéines s'assemblent pour former des canaux hydrophiles ou des pores, qui traversent la membrane de part en part. Les canaux augmentent et régulent les flux d'eau et d'ions au travers des membranes. On parle alors de diffusion par transporteurs.

### **1.11. Les membranes phospholipidiques (lipidiques) à l'interface air-eau**

Lorsqu'une bicouche, c'est-à-dire un assemblage de deux monocouches, est soumise à une source d'énergie (chaleur), il y a transition de phase. La bicouche supérieure n'étant attachée à aucun substrat, elle évolue plus librement et l'on peut donc l'étudier en tant que bicouche naturelle. Dans la phase gaz, les molécules sont très espacées et s'agitent beaucoup au sein de la bicouche par diffusions latérales et transversales.

### **1.12. Paramètres influençant la membrane phospholipidique**

Plusieurs facteurs peuvent influencer le comportement des phospholipides dans une membrane phospholipidique et donc influencer la membrane phospholipidique elle-même : la température, le pH et la présence de polymères (M. Michel., 2005).

\* La température est un facteur important car chaque phospholipide pur possède une température de transition de phase qui correspond au passage réversible d'un état fluide du type cristallin vers un état figé du type gel (Schechter et *al.*, 1993 ; Heimburg et *al.*, 2000 ; Rappolt et *al.*, 2000).

La température de transition de phase augmente avec le nombre d'interactions attractives entre phospholipides, notamment les interactions hydrophobes.

\* Les phospholipides ont une tête zwitterionique ou chargée (Figure 24). Ainsi, on peut s'attendre à des modifications du comportement des lipides avec le pH. Un changement de la valeur du pH externe peut modifier la charge de la tête polaire ou son hydratation. Cela a pour effet de diminuer les forces attractives entre deux têtes polaires voisines. Cet effet est réversible si on diminue à nouveau le pH (Lee et *al.*, 1999).

\* La présence de polymères influence également la membrane phospholipidique. Dans la nature, les membranes biologiques sont naturellement recouvertes de polymères, ce qui permet de limiter et de contrôler les contacts entre cellules. Cette couche fait partie d'un édifice plus complexe appelée glycocalix (Lipowsky et *al.*, 1995 ; Alberts et *al.*, 1989). Un système biomimétique constitué d'une vésicule géante sur laquelle a été greffée une couche de polymères solubles (polyéthylène glycol par exemple) a été réalisée (Baekmark et *al.*, 1995 ; Bruinsma et *al.*, 2000). Le même type d'expérience a été réalisé sur de petites vésicules (Kuhl et *al.*, 1994). D'un point de vue physique, la présence de d'une couche de polymère greffée à la surface d'une vésicule augmente le module de rigidité de courbure de façon importante. De même Ge et *al.*, (2003) ont montré que l'adsorption de polyélectrolytes augmente de façon importante la rigidité de la membrane phospholipidique, sans pour autant affecter la perméabilité de la membrane. De plus, ils ont montré que des vésicules

phospholipidiques recouvertes de polyélectrolytes restent intactes même en présence d'un détergent (interactions faibles de type électrostatique).

Des mesures de mobilité électrophorétique ont été effectuées afin d'étudier les interactions polyélectrolytes-liposomes chargés. L'addition d'un polymère de charge opposée à la charge des groupes polaires lipidiques engendre une mobilité électrophorétique proche de zéro. Cela signifie que la charge de la surface externe de la vésicule a été modifiée suite à la complexation vésicules-polyélectrolytes. De plus, la présence de polyélectrolytes dans une solution de liposomes chargés peut engendrer des phénomènes d'agrégation et de floculation par pontage inter-liposomes si des précautions expérimentales particulières ne sont pas prises (forces ioniques, longueur moyenne de chaînes polyélectrolytes, pH par exemple) (M. Michel, 2005).

Du point de vue microscopique, le couplage polyélectrolytes-bicouches lipidiques aboutit à la formation de domaines lipidiques (Mitrakos et *al.*, 1996) dans la membrane grâce à des interactions électrostatiques entre les lipides chargés et des polyélectrolytes de charge opposée. La taille des domaines varie en fonction de la masse moléculaire du polyélectrolyte.

\* L'insertion de molécules telles que le cholestérol peut également mener à des modifications des caractères physiques des membranes phospholipidiques. En effet, le cholestérol est une molécule possédant un caractère hydrophobe très marqué, ce qui lui permet de s'insérer au sein d'une membrane phospholipidique (Houslay et *al.*, 1982). La présence du cholestérol au sein de la membrane phospholipidique tend à la rigidifier. Cette rigidification provient du fait que le cholestérol engendre un effet de condensation forte dans la membrane phospholipidique, faisant ainsi diminuer l'aire occupée par les molécules de phospholipides (Schechter et *al.*, 1993).

### **1.13. Diffusion de petites molécules à travers la bicouche phospholipidique**

Depuis un certain nombre d'années, il a été montré que quelques solutés amphiphiles de faible masse moléculaire sont capables de diffuser librement au travers de la membrane phospholipidique (Walde et *al.*, 1998 ; Walde et *al.*, 2001). Pour de tels solutés, les liposomes ne sont plus uniquement utilisés comme réservoirs de molécules actives mais peuvent être utilisés en tant que réacteurs. Ils ont préparé des liposomes à partir de POPC, dans lesquels une enzyme, l' $\alpha$ -chimotrypsine, a été encapsulé. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse des substrats de petites tailles qui sont mis en contact d'une solution de liposomes contenant l' $\alpha$ -

chymotrypsine. Seuls les substrats de masse moléculaire inférieure à une valeur critique de l'ordre de 350 g par mole franchissent la paroi de la membrane phospholipidique.

L'immobilisation sur une surface des systèmes étudiés par Walde et *al.*, permettrait de développer des surfaces capables de reconnaître sélectivement des molécules cibles, c'est à dire de développer de nouveaux biocapteurs. Ainsi, un liposome immobilisé sur support et contenant une enzyme sera capable de réagir uniquement si son substrat est à proximité de la surface (Michel M., 2005).

#### **1.14. Diffusion de quelques HAP à travers la bicouche phospholipidique**

Les travaux de Walde et *al.*, (2001), ont montré que les substrats de masse moléculaire inférieure à 350 g/mole franchissent la paroi de la membrane phospholipidique. Les 16 HAP de la liste de l'US-EPA ont une masse moléculaire comprise entre 128,2 g/mole (naphtalène) et 276,3 g/mole benzo(g,h,i) pérylène (Tableau 5). La masse moléculaire de chaque HAP est inférieure à 350 g/mole. En conséquence, nous pouvons dire que ces HAP peuvent facilement franchir la paroi de la membrane phospholipidique.

## **2. Conclusion**

L'exposition à des concentrations micromolaires d'un polluant commun alimentaire, le B[a]P, cause une inhibition rapide, directe et profonde de la lipolyse au niveau du tissu adipeux (Irigaray et *al.*, 2005) stimulée par l'adrénaline et la noradrénaline. Cette inhibition de la lipolyse s'accompagne d'un gonflement de la bicouche lipidique suite à une internalisation du polluant (Plant et *al.*, 1995 ; Jimenez et *al.*, 2002). Ce qui met la cellule dans une situation de stress dû à la formation d'espèces radicalaires très réactives (ROS) dans l'organisme. Tout stress entraîne une dépense énergétique pour l'organisme donc un coût, et, s'il se prolonge, il y a un risque non négligeable que d'autres effets apparaissent (sur la croissance, la reproduction etc.) (Adams, 1990 ; Calow, 1991).

Les cytochromes P 450 ou CYP débarrassent l'organisme des ROS. L'activité des CYP dépend du génotype et de l'environnement, elle est depuis peu utilisée en tant que biomarqueur permettant d'évaluer les conséquences d'une exposition à des molécules environnementales ou la susceptibilité à certaines pathologies (Guéguen et *al.*, 2006) sur les populations et communautés dans leur environnement naturel (Lagadic et *al.*, 1997)

Nos recherches sur les interactions polluants-récepteurs membranaires adrénrgiques dans le tissu adipeux murin nous permettront de mieux élucider les voies d'inhibition de la lipolyse induite par les polluants en tenant compte des susceptibilités génétiques de chaque souris.

## Partie 3

### Effet membranaire

#### A. Accumulation des polluants dans les membranes modèles

Les résultats du chapitre précédent ont donné la preuve que l'effet des polluants sur les mécanismes lipolytiques ne doit pas être recherché sur l'action directe du polluant sur la réactivité du récepteur par rapport à son ligand.

Nous avons alors testé l'hypothèse avancée par le travail de Jimenez et *al.*, (2002) selon laquelle l'accumulation des polluants de type hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) est généralement recherchée dans la vésicule lipidique, eu égard à la lipophilie de ces substances aromatiques.

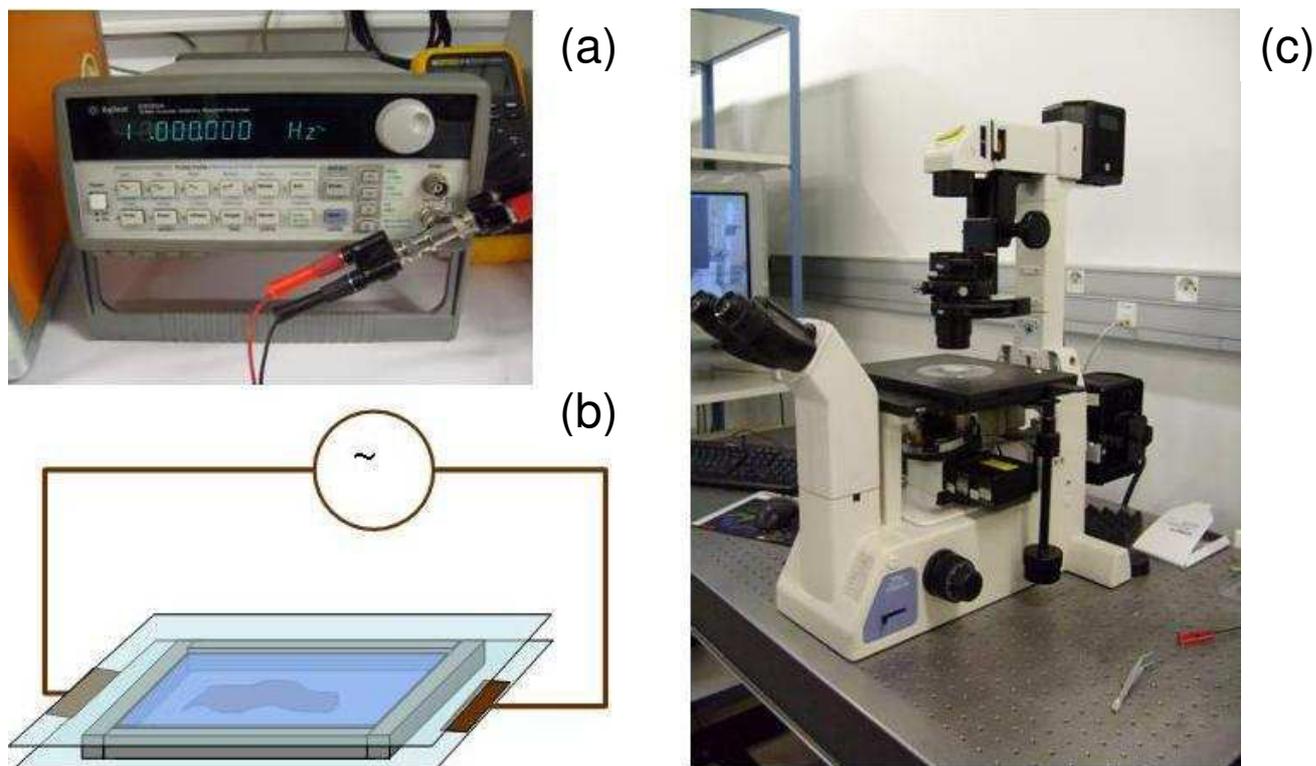
Comme nous l'avons dit plus haut, nous avons utilisé deux méthodes d'investigation de l'accumulation des polluants aromatiques polycycliques (HAP) dans la membrane adipocytaire, en étudiant cette accumulation dans des membranes modèles. Dans ce but, nous avons utilisé des vésicules géantes (GUVs) de DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine). Dans une première méthode, du pyrène (C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>) ou du fluoranthène (C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>), deux polluants HAP, ont été incorporés dans la membrane dès la fabrication des GUVs : nous avons testé des concentrations d'une ou deux molécules de polluant pour deux molécules de phospholipide. Dans une seconde configuration, nous avons introduit des GUVs de DOPC dans des solutions de glucose incorporant les polluants à des concentrations micromolaires, et nous avons mis en évidence une incorporation des polluants dans la membrane. L'observation quantitative de la fluorescence des vésicules au moyen de la microscopie optique, nous a permis de calculer les concentrations de polluant dans les membranes dans cette seconde configuration.

#### 1. Matériels et méthodes

##### 1.1. Matériels

- Le phospholipide utilisé dans cette étude est le 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC, 99%, Sigma-Aldrich).
- Les polluants utilisés sont le pyrène et le fluoranthène (Sigma-Aldrich).
- Le sucrose (99%, Sigma-Aldrich).

- Le glucose (99%, Sigma-Aldrich).
- Le générateur de courant électrique (Agilent, N°33120 A).
- Le microscope optique inversé (Nikon TE 200) muni d'une caméra numérique (monochrome Diagnostic Instruments) et équipé pour l'épifluorescence.
- Les lames ITO (Indium Tin Oxyde) métallisées.
- La pâte de scellement Vitrex (Sigillum Wax, Copenhag, Danemark).
- L'osmomètre (Osmomat 030 Gonotec, Allemagne).



**Figure 26** : Equipements de l'électroformation et de l'observation des vésicules de phospholipide (DOPC). (a) : Générateur de courant électrique. (b) : Principe de la technique d'électroformation. (c) : Microscope optique inversé, équipé avec les modes Contraste de phase, DIC et fluorescence.



**Figure 27** : Deux polluants (HAP). (a) : le pyrène ( $C_{16}H_{10}$  (Masse moléculaire 202,3 g / mole). (b) : le fluoranthène ( $C_{16}H_{10}$  (Masse moléculaire 202,3 g / mole))

## **1.2. Méthodes**

### **1.2.1. Préparation des solutions**

#### **1.2.1.1. Préparation de la solution de DOPC en solvant organique**

Le DOPC est solubilisé dans du chloroforme à 1 mg/ml. Il est conservé au congélateur à -18°C.

#### **1.2.1.2. Préparation des solutions de polluants mélangés avec le DOPC (première méthode)**

Le pyrène et le fluoranthène sont aussi solubilisés chacun dans du chloroforme. La concentration massique de toutes les solutions mère d'HAP préparées est de 0,127 mM soit 25,7 mg.mL<sup>-1</sup>. Puis 50 µL de la solution-mère ont été dilués dans 1 ml de chloroforme pour avoir une concentration finale de 0,122 mg/mL et 0,244 mg/ml pour la première méthode. On mélange ensuite 10 ou 20 µL de solution mère de DOPC avec 90 ou 80 µL de l'une de ces solutions de polluant. C'est de ce mélange qu'on prélève pour l'électroformation.

#### **1.2.1.3. Préparation des solutions de polluants dans le glucose (deuxième méthode)**

On prélève suivant le cas 4,3 ; 8,7 et 17,4 microlitres de la solution-mère (0,127mM) de polluants que l'on introduit dans un bécher contenant chacun 10 mL de solution de glucose à 0,1 M. Ces solutions de glucose auxquelles on a ajouté le polluant sont agitées pendant 60 à 120 minutes pour évaporer le chloroforme.

Une fois débarrassés du chloroforme, 1 à 1,2 mL de solutions de glucose + polluant sont versées sur une lame contenant déjà une préparation de vésicules. Cet ensemble est recouvert d'une lamelle et observé au microscope optique.

Pour cette 2<sup>ème</sup> méthode, nous avons aussi dissous les polluants dans du dichlorométhane pour mieux contrôler leur solubilité dans l'eau.

#### **1.2.1.4. Contrôle des molarités**

La molarité des solutions de sucrose (0,1 M) et de glucose (0,1 M) est contrôlée par l'osmomètre de façon à avoir une différence de molarité inférieure à 2%.

#### **1.2.1.5. Formation de vésicules géantes**

On dépose 10-20 µL de la solution de DOPC dans le chloroforme à l'aide d'une microseringue sur une lame métallisée. Ce dépôt est délimité par une couche de pâte inerte de

scellement (Vitrex) formant une petite cellule d'environ 100-200 mm<sup>3</sup>. La lame est déposée dans un dessiccateur puis mis sous vide pendant 30-120 minutes afin d'évaporer le chloroforme. On remplit ensuite le puit porté par la pâte Vitrex avec une solution de sucrose filtrée à 0,2 µm, afin d'éliminer toute bactérie éventuelle. On recouvre la cellule d'une seconde lame ITO de manière à former une cellule fermée. On branche cette cellule au générateur de tension. On applique ainsi une tension alternative de fréquence 10 Hertz (Hz) et d'amplitude 1 Volt pendant deux heures.

Des vésicules géantes principalement unilamellaires se forment à partir du film de phospholipides.

Après la formation des vésicules, le contenu de la cellule est aspiré à l'aide d'une micropipette et transféré dans un tube Eppendorf.

On y ajoute une solution de glucose (environ 1 à 2 mL) à la même pression osmotique que la solution de sucrose afin d'éviter un choc osmotique qui déstabiliserait les vésicules.

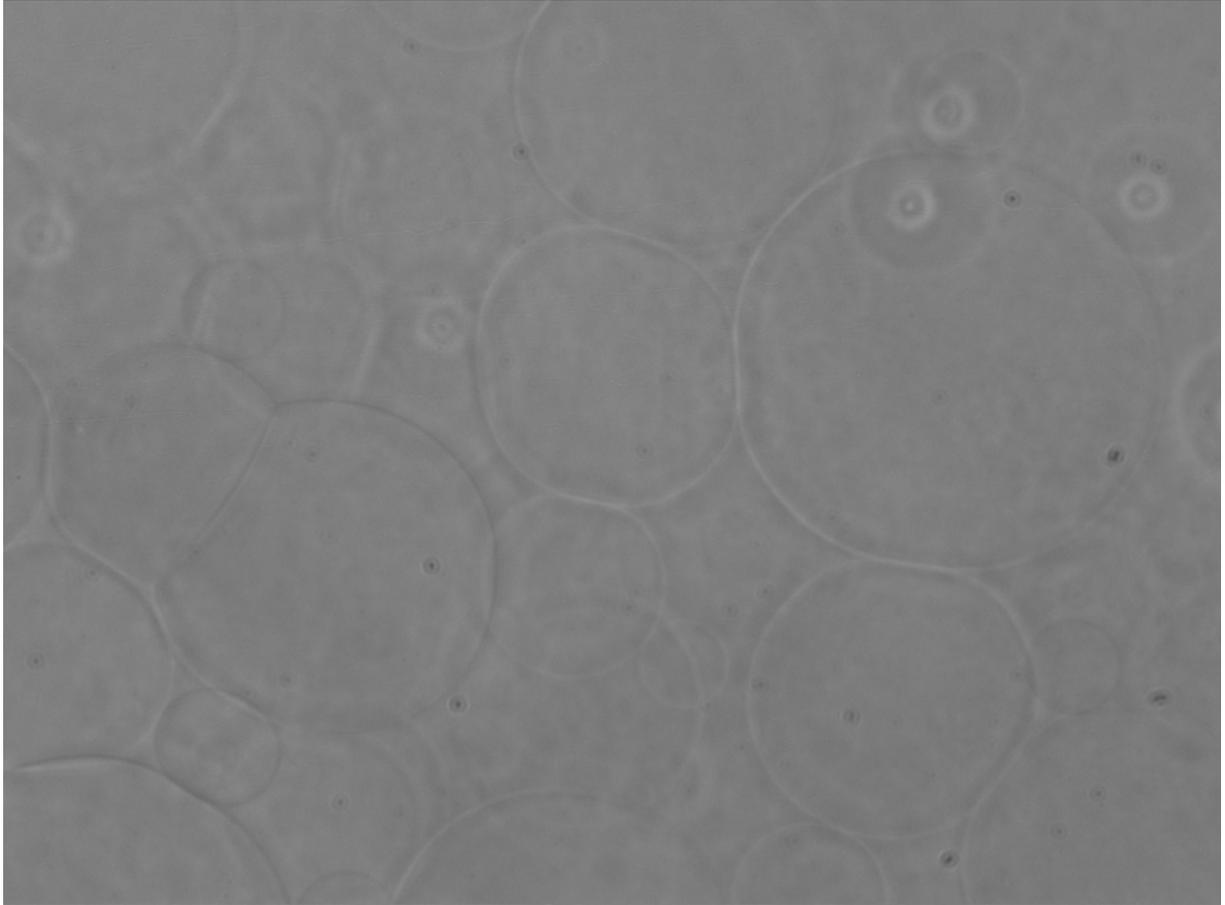
## **2. Observation au microscope**

On prélève de la solution précédente 50 à 100 µL que l'on dépose sur une lame couvre objet qui forme la base de la cellule d'observation, comportant également un espaceur en silicone et une seconde lame qui ferme la cellule. Cette préparation est observée au microscope, soit avec un objectif 40 X DIC, soit avec un objectif 40 X contraste de phase.

Une lampe à mercure fournit une illumination pour la visualisation en mode fluorescence.

Un bloc d'épifluorescence avec les filtres EX 450-490 nm / BA 520 nm, muni d'un miroir dichroïque 505 nm est utilisé. Cette combinaison de filtres est adaptée aux spectres d'absorption et d'émission du pyrène et du fluoranthène (Tableau 11).

Les images sont enregistrées à l'aide de la caméra digitale et stockées sur un ordinateur. On analyse ensuite ces images pour mesurer la fluorescence des vésicules.



**Figure 28** : Vésicules géantes de DOPC (sans HAP) observées au microscope optique dans la cellule de pousse (en contraste de phase).

**Tableau 11** : Conditions de fluorescence optimisée pour la détermination des analytes des HAP

HAP	Temps de rétention (min) <sup>a</sup>	Longueur d'onde d'excitation (nm) <sup>b,c</sup>	Longueur d'onde d'émission (nm) <sup>b,c</sup>	Temps (min)
(A) Naphtalene	15.3	280	355	0-21,8
(B) Acenaphtene	19.1	280	355	0-21.8
(C) Fluorene	19.8	280	355	0-21.8
(D) Phenanthrene	21.4	280	355	0-21.8
(E) Anthracene	22.9	250	420	21.8-25.8
(F) Fluoranthene	24.3	250	420	21.8-25.8
(G) Pyrene	25.4	250	420	21.8-25.8
(H) p-Terphenyl-d14 std <sup>d</sup>	27.0	270	390	25.8-30.0
(I) Benz[a]anthracene	28.6	270	390	25.8-30.0
(J) Chrysene	29.3	270	390	25.8-30.0
(K) Benzo[b]fluoranthene	31.6	290	410	30.0-36.0
(L) Benzo[k]fluoranthene	32.7	290	410	30.0-36.0
(M) Benzo[a]pyrene	33.9	290	410	30.0-36.0
(N) Dibenz[a,h]anthracene	35.3	290	410	30.0-36.0
(O) Benzo[g,h,i]perylene	36.7	300	465	36.0-75.0
(P) Indeno[1,2,3-cd]pyrene	37.6	300	465	36.0-75.0

<sup>a</sup> Valeurs de temps de conservation, varient entre 0,1 et 0,2 min

<sup>b</sup> Valeurs maxima d'excitation et d'émission (**Perfetti et al., 1992**)

<sup>c</sup> Acenaphthalene a été exclu de cette étude en raison de ses faibles propriétés fluorescentes (**Perfetti et al., 1992; Marriot et al., 1993; Williamson, 1996; El Harrak et al., 1998**).

Dp-Triphényle-D14 a été utilisé seulement comme un marqueur de temps de rétention (norme de référence). D'après **K.S. Williamson et al. Chemosphere 49 (2002) 703-715**

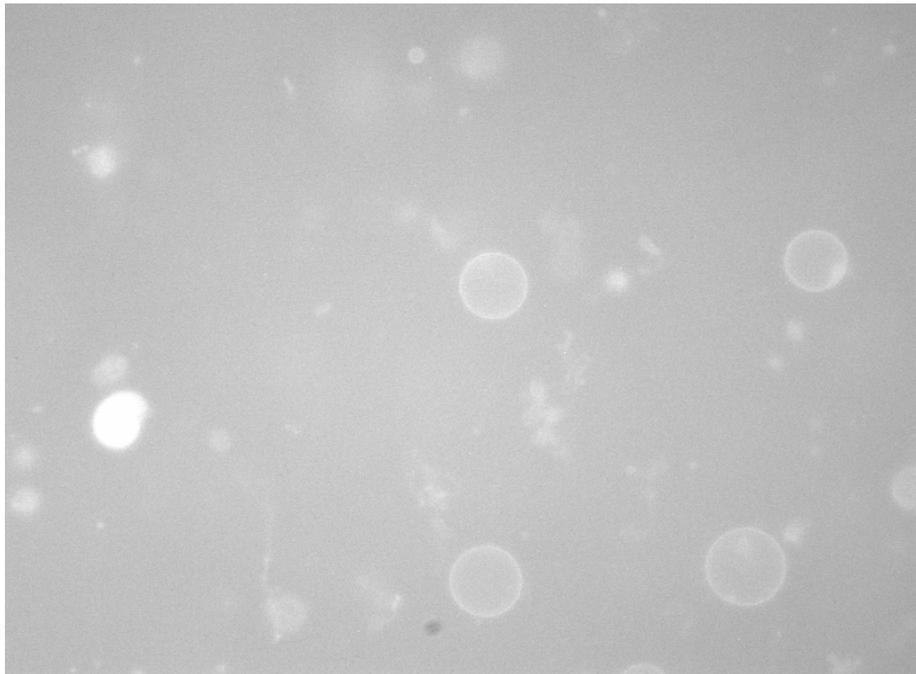
### 3. Résultats

Nous avons fait une étude quantitative de la fluorescence des vésicules. Comme nous allons le voir, ces intensités de fluorescence sont proportionnelles à la quantité de molécules polluantes introduites dans les vésicules phospholipidiques.

#### Méthode de calcul de la fluorescence d'une vésicule

Les données des différentes observations sont traitées avec les logiciels Image J, ou bien avec un logiciel similaire développé au laboratoire.

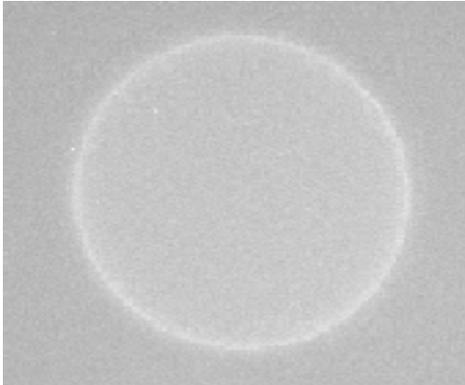
A une même concentration molaire de polluant dans la membrane, la quantité de pyrène et de fluoranthène introduite dans une vésicule dépend de sa taille. Nous mesurons l'intensité de fluorescence d'une vésicule ( $I_v$ ) pour un grand nombre de vésicules et nous vérifions que  $I_v$  est proportionnelle à la surface de membrane de la vésicule.



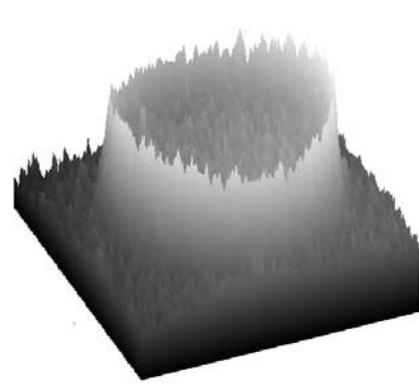
**Figure 29** : Vésicules formées d'un mélange de DOPC et de fluoranthène observées en fluorescence

La figure 29 représente un certain nombre de vésicules fluorescentes qui se détachent du fond lumineux appelé background. Ce fond n'est pas noir car il y a une fluorescence résiduelle due à la grande quantité de vésicules dans les champs d'observation. Pour calculer l'intensité de

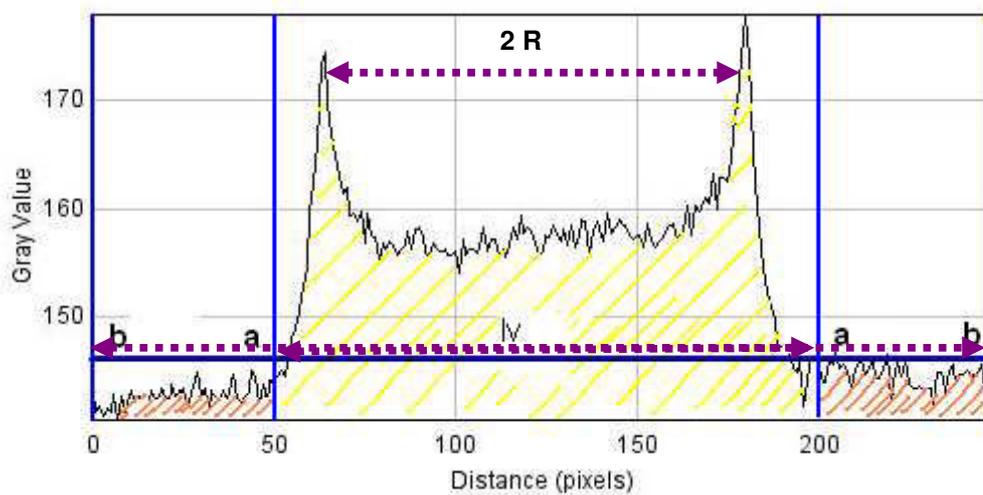
fluorescence émise par une vésicule particulière, on doit soustraire l'intensité résiduelle à l'image, puis intégrer l'intensité sous la vésicule.



**Figure 30** : Une vésicule fluorescente



**Figure 31** : Profil en 3D d'une vésicule fluorescente



**Figure 32** : Profil de fluorescence diamétral d'une vésicule. Les deux pics d'intensité sont colocalisés avec la membrane : le diamètre de la vésicule est mesuré comme la distance entre ces deux pics. Domaine (a) : région centrée sur la vésicule où l'intensité de fluorescence ( $I_v$ ) est à intégrer. Domaine (b) : région sur laquelle on calcule l'intensité du fond ( $I_{back}$ ).

- L'intensité du background ( $I_{back}$ ) est mesurée comme la moyenne de l'intensité de fluorescence par pixel dans une région voisine de la vésicule (zone annulaire comprise entre  $2a$  et  $2b$ ).
- L'intensité totale ( $I_{total}$ ) est l'intensité intégrée sur tous les pixels de la zone de rayon  $a$  du profil, qui représente la somme de la fluorescence résiduelle et de la fluorescence due à la vésicule.
- L'intensité de la vésicule ( $I_v$ ), due seulement à la vésicule est calculée à partir de :

$$I_v = (I_t - I_b)\pi a^2$$

Où :  $a$  est le rayon approché du cercle vésiculaire

$I_t$  est l'intensité totale intégrée sur la zone de rayon  $a$

et  $I_b$  est l'intensité de fluorescence du background (fond)

### 3.1. Première méthode

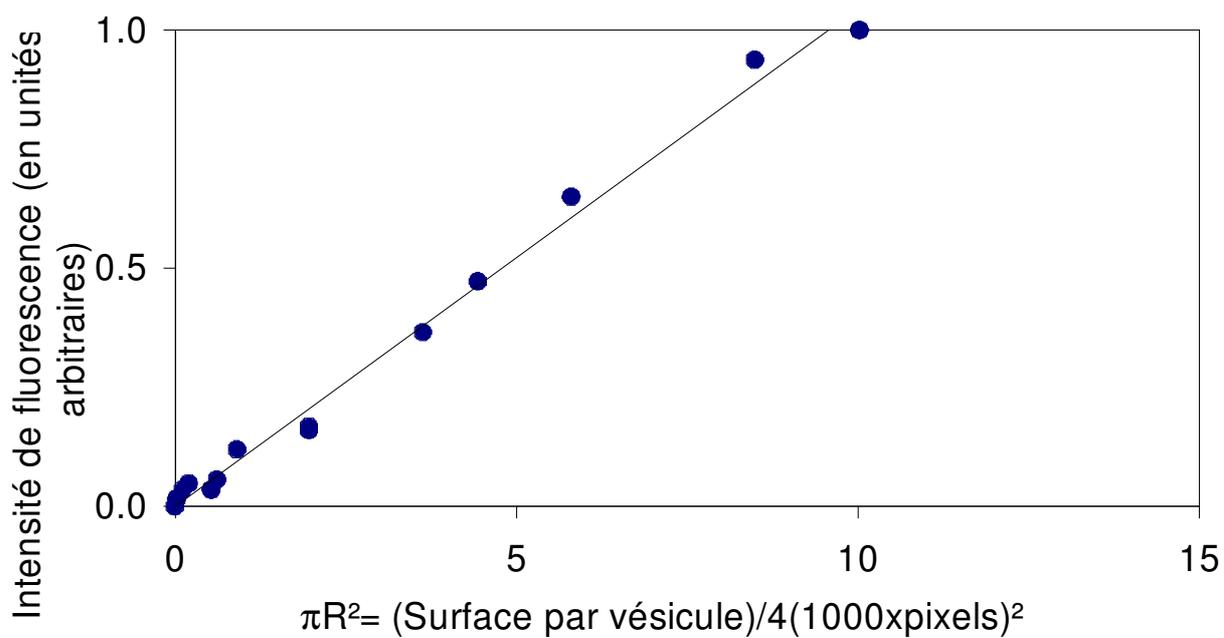
#### Vésicules formées à partir d'un mélange de DOPC + polluant

La méthode d'incorporation du polluant est décrite au point 1.2.1.2. (Partie 3).

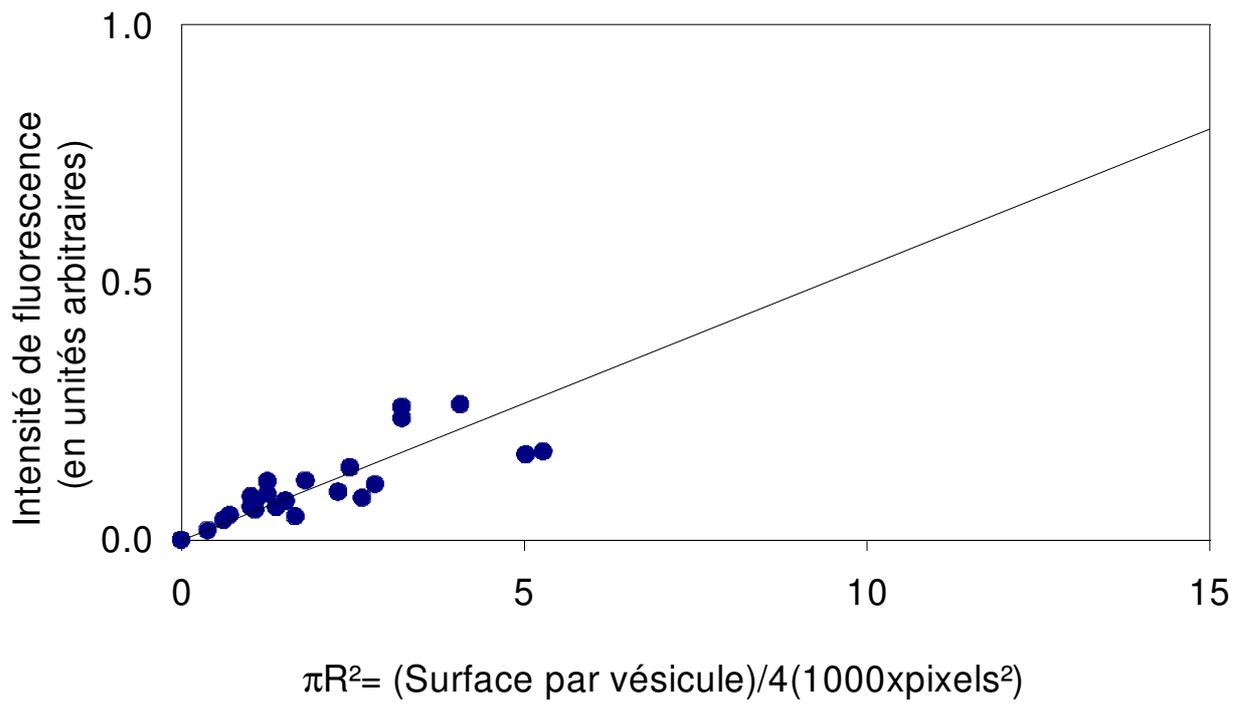
Nous avons réalisé quatre séries de vésicules. Des vésicules contenant du pyrène ou du fluoranthène aux concentrations molaires 0,5 et 0,33 sont réalisées.

Les figures (33 à 36) montrent que les intensités de fluorescence ( $I_v$ ) sont proportionnelles à la surface de la vésicule. De plus, nous avons vérifié que cette loi n'est pas modifiée avec le temps ; des vésicules qui séjournent plusieurs jours dans la solution aqueuse qui les contient ne voient pas leur fluorescence évoluer. On peut donc en déduire qu'il n'y a pas de "fuite" de polluant avec le temps. Le polluant incorporé dans la membrane y reste piégé, du moins à l'échelle de temps de nos observations. Au vu de la loi de proportionnalité observée sur les figures 33 à 36 nous postulons que la fraction molaire de polluant incorporée dans la membrane est identique à celle que nous avons imposée au départ, lors du mélange des composants, avant l'électroformation.

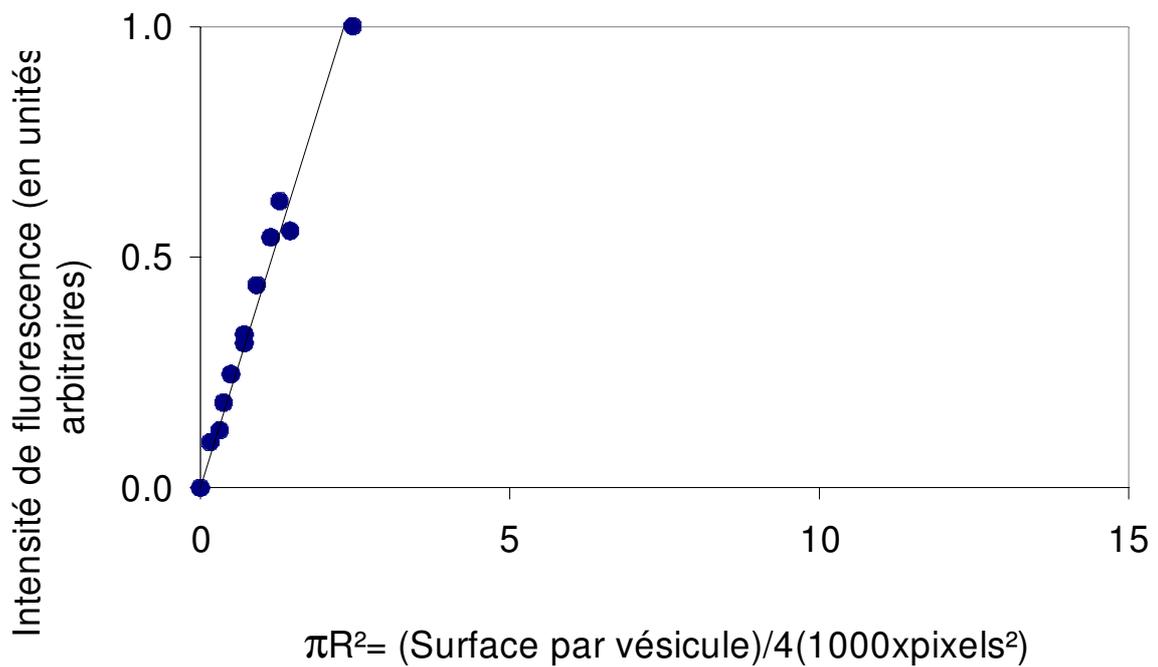
On constate sur les figures 35 et 36 que les vésicules contenant du fluoranthène sont en moyenne plus petites que les vésicules contenant du pyrène. Nous n'avons pas d'explication pour ce phénomène.



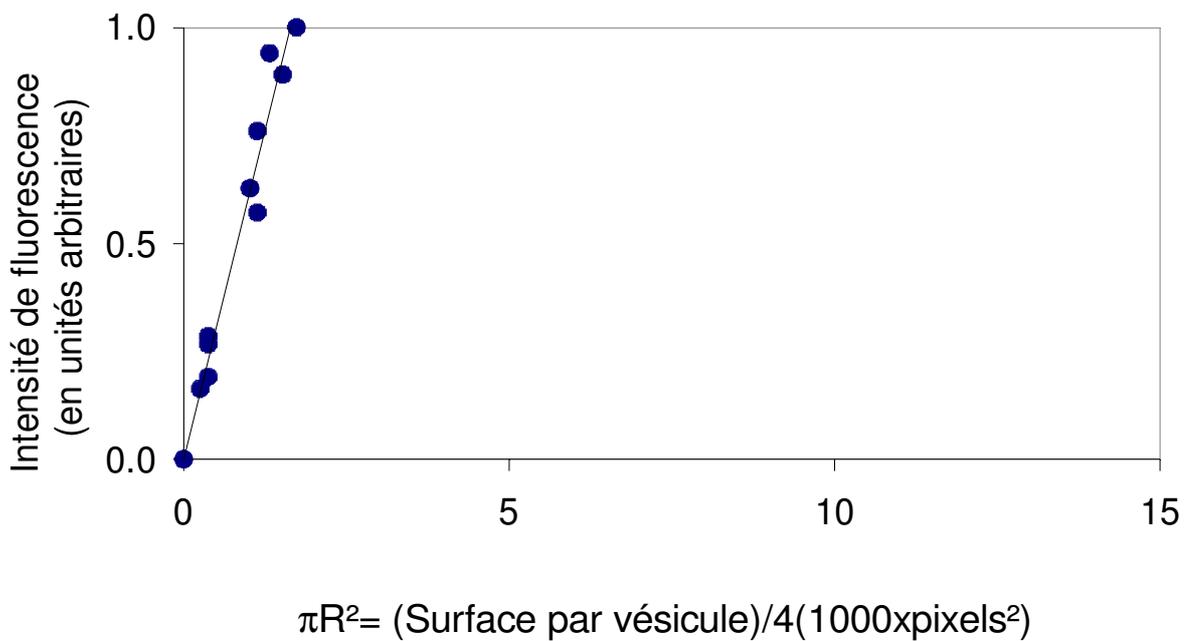
**Figure 33** : Etude quantitative de la fluorescence de vésicules contenant une fraction molaire 50% de pyrène et 50% de DOPC



**Figure 34** : Etude quantitative de fluorescence de vésicules contenant une fraction molaire 33% de pyrène et 67% de DOPC



**Figure 35** : Etude quantitative de fluorescence de vésicules contenant une fraction molaire 33% de fluoranthène et 67% de DOPC



**Figure 36**: Etude quantitative de la fluorescence de vésicules contenant une fraction molaire 50% de fluoranthène et 50 % de DOPC

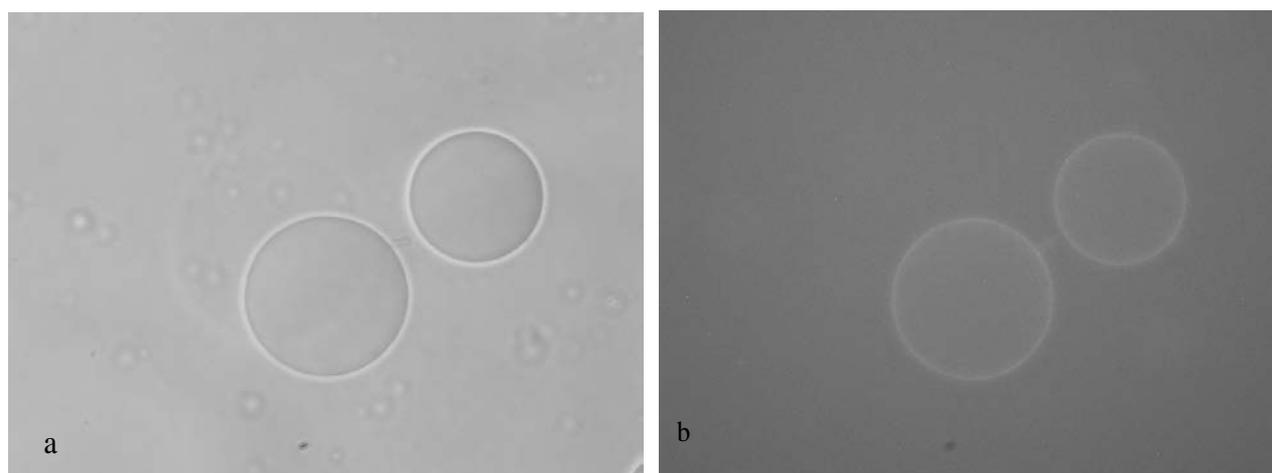
### 3.2. Deuxième méthode

#### **Vésicules de DOPC introduites dans une solution aqueuse micromolaire de polluant.**

La méthode d'incorporation du polluant est décrite au point 1.2.1.3. (Partie 3).

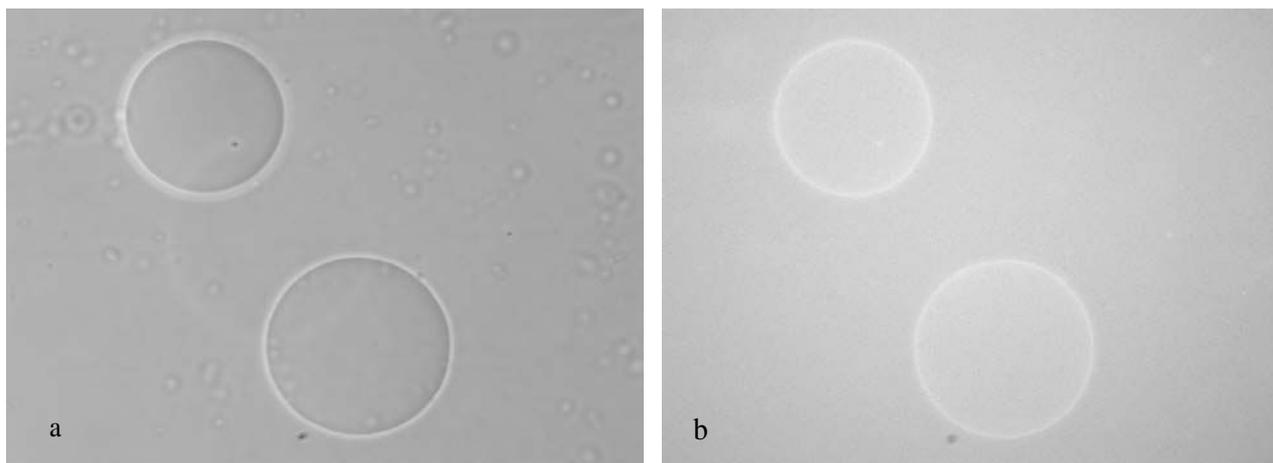
Pour cette seconde méthode qui consiste à plonger des vésicules de DOPC déjà formées dans une solution aqueuse micromolaire de polluants, on observe que les vésicules sont fluorescentes; ce qui montre que les polluants se sont introduits dans la membrane. A noter que nous n'avons pas cherché à observer la cinétique d'apparition de la fluorescence dans les vésicules à partir de leur mise en contact avec le polluant. Ces images sont réalisées 1 heure après avoir plongé les vésicules dans la solution aqueuse de polluant. Nous avons également vérifié que la fluorescence détectée n'évolue pas avec le temps d'observation.

Les figures 39 et 40 montrent que les intensités de fluorescence ( $I_v$ ) sont proportionnelles à la surface de la vésicule. Cela prouve que le polluant est réparti de façon homogène dans la membrane et qu'il n'en ressort pas.



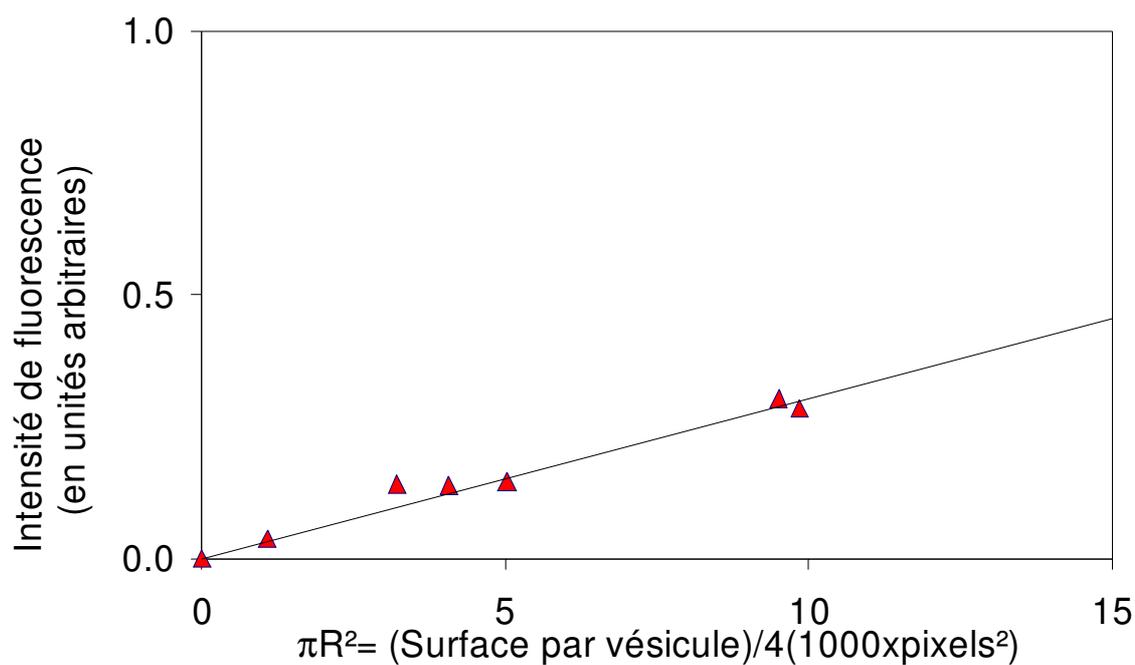
**Figure 37 :**

a : Vésicules de DOPC plongées dans une solution aqueuse micromolaire de pyrène observées en mode transmission. b : Les mêmes vésicules observées en fluorescence.

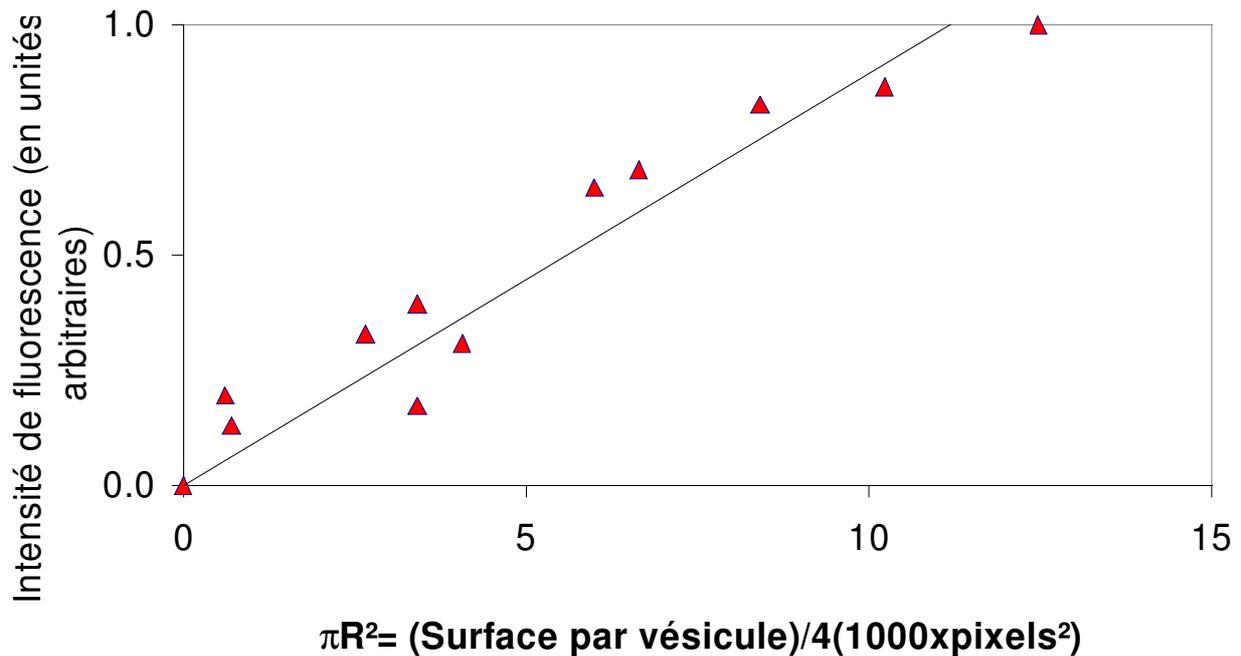


**Figure 38 :**

**a :** Vésicules de DOPC plongées dans une solution aqueuse micromolaire de fluoranthène observées en mode transmission. **b :** Les mêmes vésicules observées en fluorescence.



**Figure 39 :** Etude quantitative de la fluorescence de vésicules de DOPC plongées dans une solution aqueuse micromolaire de pyrène



**Figure 40** : Etude quantitative de la fluorescence de vésicules de DOPC plongées dans une solution aqueuse micromolaire de fluoranthène

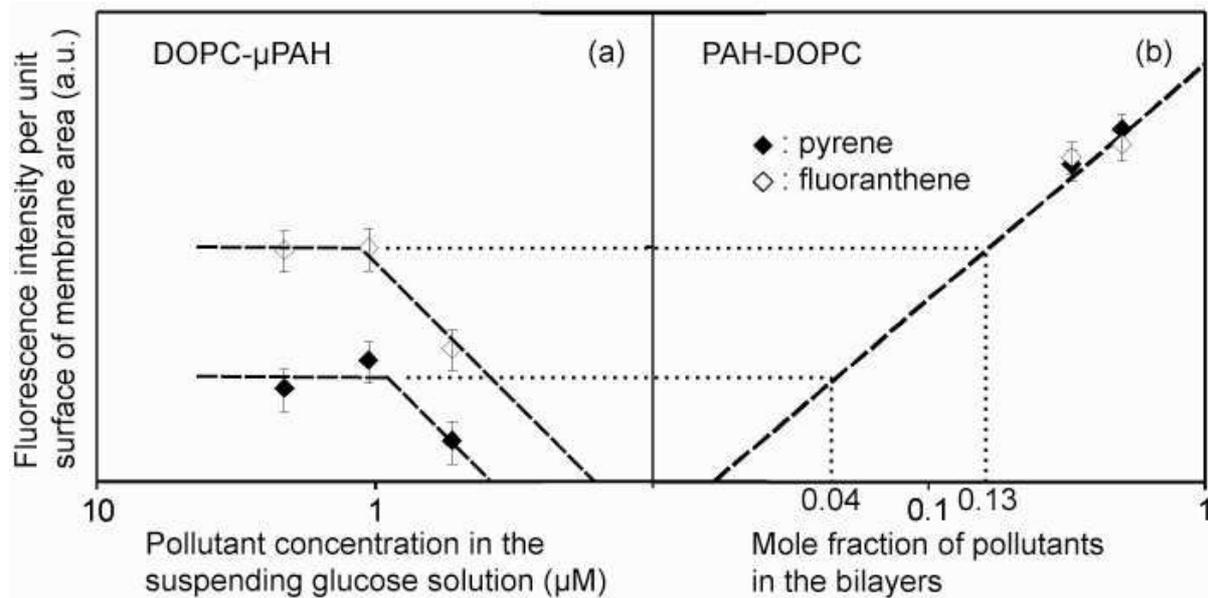
La quantité de polluants insérés dans la membrane est représentée dans le diagramme ci-dessous (Figure 41)

La partie droite du diagramme montre que les valeurs de l'intensité de fluorescence par unité de surface sont proportionnelles à la fraction molaire de polluant insérée dans le mélange polluant-phospholipide. Cela montre la pertinence de la méthode pour la calibration de la quantité de molécules polluantes présentes dans la membrane.

Dans le diagramme de gauche, cette calibration est utilisée pour connaître la quantité de polluant absorbée par la membrane lorsque celle-ci est plongée dans une solution aqueuse micromolaire de polluants.

Pour trois concentrations distinctes micromolaires  $(0,53; 1,06; 2,24)10^{-6}$  Mole/L, les vésicules de DOPC plongées dans ces solutions aqueuses de fluoranthène contiennent une fraction molaire comprise entre 6% et 13% tandis que pour ces mêmes concentrations micromolaires de pyrène, les vésicules de DOPC plongées dans ces solutions contiennent les fractions molaires qui sont comprises entre 2,4% et 6% (Figure 41). On note surtout que l'intensité de fluorescence sature au-delà d'une certaine quantité de polluant ; compte tenu des barres

d'erreur, on estime finalement que les concentrations saturantes  $C_s$  suivantes sont obtenues pour le DOPC :  $C_s(\text{fluoranthène}) = 13\%$ ,  $C_s(\text{pyrène}) = 4\%$



**Figure 41** : Diagramme de droite : fluorescence par unité de surface de membrane pour les vésicules mixtes DOPC-polluant, formées par mélange des constituants dès l'étape de pousse. Diagramme de gauche : Fluorescence par unité de surface pour des vésicules de DOPC plongées dans une solution micromolaire de polluant.

#### 4. Conclusion

Les études faites sur les vésicules phospholipidiques montrent que dans un milieu pollué, les HAP peuvent s'introduire dans les membranes phospholipidiques.

A une même concentration, pour la première méthode d'incorporation des polluants dans la membrane (incorporation directe), on ne note pas une différence remarquable entre la fluorescence des vésicules de DOPC mélangées avec du pyrène ou du fluoranthène. Mais surtout, cette fluorescence est proportionnelle à la quantité de polluant incorporée au départ du processus de pousse.

Quant à la seconde méthode (incorporation par le biais d'une solution aqueuse), les trois concentrations micromolaires explorées  $(0,53; 1,06; 2,24)10^{-6}$  Mole/L, ont permis de voir que les molécules de polluant s'accumulent dans les membranes de DOPC jusqu'à les saturer.

## Partie 3

### Effet membranaire

#### **B. Etude des propriétés élastiques des vésicules de DOPC sans ou avec polluants : expériences de micropipette**

L'objectif de cette expérience est de comparer les propriétés mécaniques des vésicules sans polluants ou avec polluants. Il nous paraît important de déterminer si le polluant inséré dans une membrane a un effet sur sa rigidité.

Les vésicules lipidiques ont une tension très faible comparée à d'autres systèmes interfaciaux ; elle est de l'ordre de  $10^{-5}$  à  $10^{-8}$  N/m comparée par exemple à la tension de surface de l'eau qui est de  $72 \times 10^{-3}$  N/m, ce qui a pour conséquence qu'on se trouve dans un régime où l'énergie de courbure domine. Par conséquent, la membrane est froissée par des fluctuations à toutes les échelles de longueur, ce qui implique qu'une partie de l'aire est stockée dans ces fluctuations. Notons qu'une partie non négligeable de ces fluctuations est à une échelle sub-optique.

La membrane d'une vésicule observée au microscope optique présente souvent des ondulations à sa surface; ce sont les fluctuations de la membrane dont la longueur d'onde est plus grande que la résolution optique. L'amplitude des fluctuations donne une idée de l'état de tension de la membrane. L'état de tension d'une vésicule géante peut être varié en modifiant la pression osmotique dans la solution aqueuse qui la contient; par exemple, en diluant un sel ou un sucre, on augmente cette pression, ce qui a pour effet de dégonfler la vésicule car la membrane est poreuse aux molécules d'eau mais imperméable au passage de ces solutés. La tension de membrane est alors diminuée.

La technique de la micropipette permet de mesurer la relation entre l'accroissement de surface projetée et la tension. Une vésicule est aspirée partiellement et de façon contrôlée dans une micropipette, ce qui a pour effet d'imposer une tension connue, et l'accroissement apparent de surface ainsi créé est directement mesurable par une analyse de contour de la vésicule. Cet accroissement de surface correspond au dépliage d'une partie des fluctuations sub-optiques. On peut ainsi augmenter la tension jusqu'à déplier quasiment l'ensemble des fluctuations. On mesure alors la surface "vraie" de la membrane. Augmenter encore la tension a pour effet d'augmenter l'aire par phospholipide.

Inventée par Rand et Burton en 1964, la technique de la micropipette a été améliorée par Evans et Hochmuth en 1977 (Rand R.P., 1964 ; Evans E. A. et Waugh R., 1976). Elle est utilisée intensément depuis les années 80 pour l'étude de cellules et de vésicules géantes

unilamellaires. C'est une technique très performante pour l'étude des propriétés mécaniques des membranes car elle permet d'appliquer des tensions très faibles.

D'autre part, l'extension de la membrane dans un capillaire d'un diamètre petit devant celui de la vésicule permet une bonne précision sur la mesure de l'excès de surface consommé.

L'utilisation d'une micropipette permet de caractériser plusieurs grandeurs physiques de la membrane : sa tension, sa viscosité (Needham D. et *al.*, 1990), son élasticité, sa perméabilité (Needman D. et *al.*, 2000). On peut mesurer aussi des forces d'interaction entre deux membranes (Evans E., 1990) ou entre une membrane et un substrat.

Ces travaux permettent de comprendre comment des cellules, quand elles sont soumises à une contrainte, peuvent se déformer, traverser des passages très étroits et retrouver leur forme initiale sans être endommagées. L'exemple le plus courant est le passage des globules rouges à travers la paroi endothéliale, grâce aux vaisseaux capillaires.

Dans le cadre de nos expériences, des membranes modèles (vésicules) de DOPC sans ou avec polluants sont caractérisées au moyen de la technique d'aspiration par micropipette, afin de déterminer comment la présence de polluant dans la membrane modifie les propriétés mécaniques de la membrane.

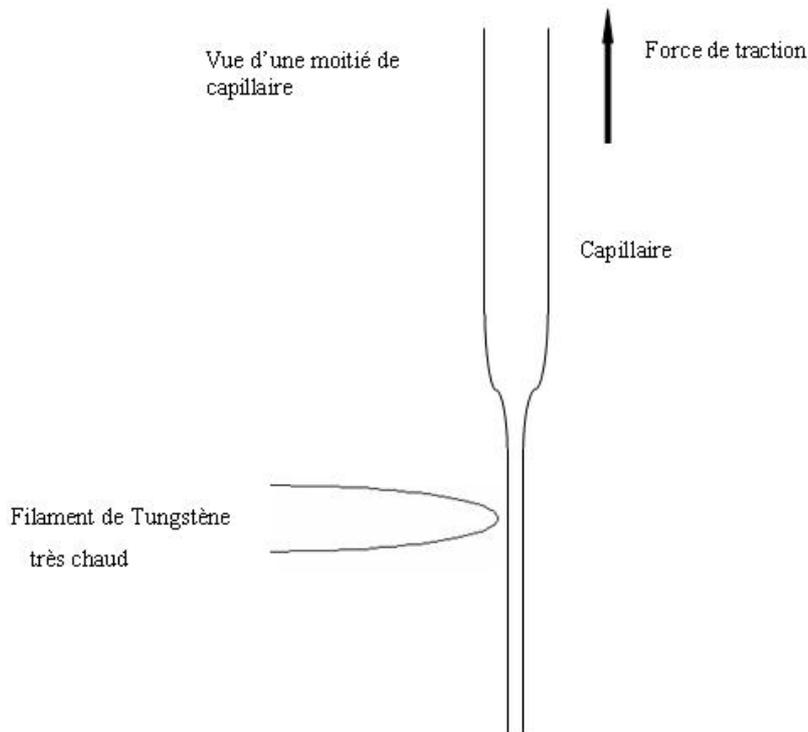
## **1. Matériels et méthodes**

### **1.1. Matériels**

Le matériel utilisé pour la fabrication des vésicules a été déjà décrit dans la partie 3 au point 1.

Nous avons également été amenés à utiliser le matériel suivant :

- Des tubes capillaires en verre de 0.58 mm de diamètre pour la fabrication des micropipettes (Clark capillaries)
- L'étireuse de micropipette (Sutter instruments Co).
- La forge (mise au point au laboratoire).
- Le dispositif d'aspiration (mis au point au laboratoire).



**Figure 42** : Principe de l'étirement d'une micropipette



**Figure 43** : L'étireuse de micropipette. Son rôle est de transformer un capillaire de verre en deux micropipettes symétriques, obtenues par chauffage intense de la zone médiane du capillaire et étirement.

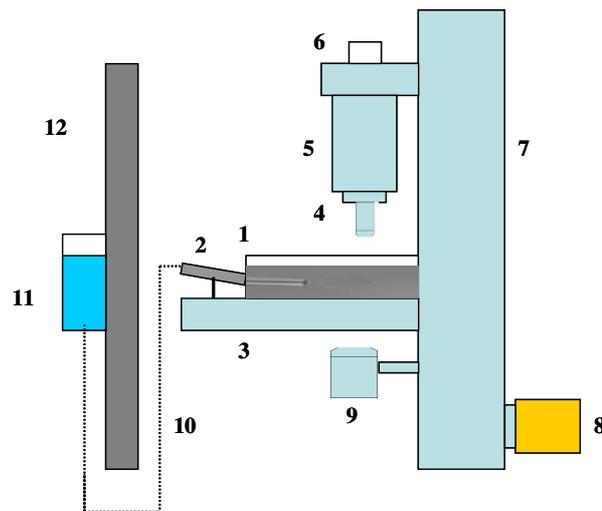


**Figure 44** : La forge : son rôle est le dimensionnement précis de la micropipette après sa fabrication dans l'étireuse.

Une pipette fabriquée par l'étireuse présente une forme de pointe, de diamètre typique 1 micromètre à son extrémité. Cette dimension est trop petite pour aspirer une vésicule géante de plusieurs dizaines de micromètres de diamètre. Il faut donc casser la micropipette à un endroit où sa dimension présente le diamètre désiré, typiquement de 8 à 12 micromètres. On utilise pour cela la forge, qui a dans notre cas été développée au laboratoire (Figure 44).

Enfin, la micropipette est montée sur un dispositif hydraulique permettant d'effectuer la succion de vésicules géantes sous microscope, afin de mesurer les propriétés mécaniques de la membrane. Ce dispositif comporte un bac d'eau cylindrique (11) d'environ 6 cm de hauteur rempli d'eau milliQ, relié par un tube en téflon (10) à un porte micropipette (2) sur lequel est fixée la pipette forgée. La pipette plonge dans la cellule d'observation (1) et son embout est positionné de façon à être visible dans le champ d'observation du microscope. La position verticale du bac d'eau peut être contrôlée de façon très précise (1 micromètre de résolution). En début d'expérience, il faut égaliser les niveaux d'eau dans la cellule d'observation et le bac (11); cela se fait simplement en réglant le niveau du bac pour que le flux de liquide qui

s'écoule dans la pipette soit nul. Tout déplacement vertical du bac résulte donc en l'application d'une pression  $P_i$  à l'intérieur de la micropipette. Les flux obtenus ne sont pas suffisants pour modifier le niveau d'eau dans la cellule. En revanche, lorsque la pipette est amenée au contact d'une vésicule géante, celle-ci est partiellement aspirée dans la pipette, jusqu'à une position d'équilibre où la tension de la membrane contrebalance la force exercée par la pression dans la pipette.



**Figure 45** : Dispositif de micropipette

1- Cellule contenant les vésicules et la micropipette. 2- Porte micropipette. 3- Platine. 4- Objectif. 5- Tube. 6- Oculaire. 7- Statif. 8- Source de lumière. 9- Condenseur. 10- Tube semi-rigide. 11- Bac d'eau. 12- Barre de métal.

La différence de pression  $P_{atm}-P_i$  est mesurée simplement en lisant la position du bac par rapport à sa position au zéro de pression. Dans notre cas le déplacement micrométrique était à affichage digital, avec une précision de 1 micromètre, correspondant à une précision sur la pression de 0,01 Pa.

Le microscope Nikon permet l'observation de l'aspiration avec l'objectif 40X en mode DIC. Une caméra enregistre les images de l'aspiration de la vésicule dans la pipette, qui sont ensuite analysées à l'aide d'un logiciel élaboré au laboratoire.

## **1.2. Méthodes**

### **1.2.1. La forge de la micropipette**

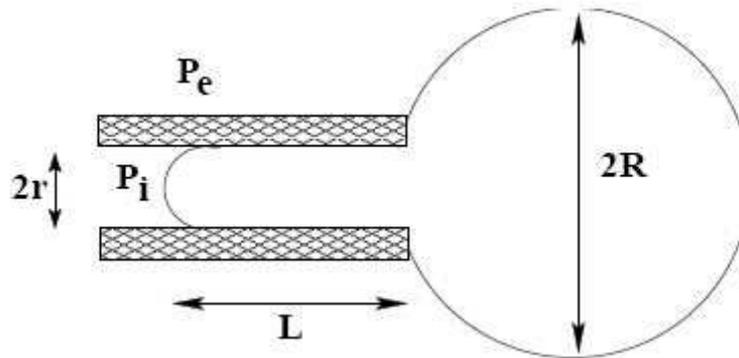
Un capillaire (GC 100.10, Haward Apparatus, 1.0 mm OD x 0.58 mm ID) est étiré à chaud jusqu'à rupture, de façon à obtenir deux parties presque égales dans l'étireuse. Les deux micropipettes ainsi formées ont chacune une extrémité très effilée (diamètre typique 1 $\mu$ m au bout) qu'il faut ensuite forger de façon à avoir un diamètre souhaitée allant de 8 à 12 micromètres.

Une demi micropipette est insérée verticalement sur le dispositif de la forge. A l'aide de 3 vis, on peut déplacer la micropipette en positions X, Y et Z. Le bout de la micropipette est observé par une caméra munie d'un objectif 40X, fournissant une résolution optique de l'ordre du micromètre. Un filament de platine recouvert d'une poudre de tétraborate de sodium (BORAX) est chauffé par le passage d'un courant électrique au delà de la température de fusion du BORAX. La pipette est alors introduite dans ce sel fondu, qui monte par capillarité dans la pipette. Quand le ménisque de liquide atteint une hauteur à laquelle le diamètre de la pipette est de la dimension désirée, on coupe l'alimentation électrique, ce qui a pour effet de vitrifier le sel de BORAX quasi-instantanément. Au cours de cette vitrification des tensions mécaniques importantes se créent dans la pipette, qui sont concentrées au niveau du ménisque, à présent gelé. Le capillaire casse rapidement et très souvent au niveau exact de ce ménisque, de façon assez nette. La micropipette peut alors être utilisée.

La demi-micropipette forgée est ensuite fixée au dispositif de succion (Figure 45) et son extrémité est amenée dans la solution de vésicules à aspirer.

### **1.2.2. Principe de l'expérience de succion dans une micropipette**

Elle consiste à suivre la déformation ( $\Delta L$ ) d'une vésicule au cours de son aspiration dans la micropipette par l'application d'une valeur décroissante de la pression à l'intérieur du capillaire. Nous pouvons représenter schématiquement une vésicule aspirée dans une micropipette de la façon suivante :



**Figure 46** : Schéma d'une vésicule partiellement aspirée dans une micropipette

**Source** : [http://eprints-scd-ulp.u-strasbg.fr:8080/846/01/HISETTE-JOURDAINE\\_2007.pdf](http://eprints-scd-ulp.u-strasbg.fr:8080/846/01/HISETTE-JOURDAINE_2007.pdf)  
Thèse de doctorat

Au cours de l'expérience de succion, divers mécanismes physiques sont mis en jeu. Pour des pressions d'aspiration inférieures à une certaine valeur, la surface fluctuante de la membrane de la vésicule se déplie et ceci fait apparaître une partie de l'excès de surface contenu dans les fluctuations. Au-delà de cette valeur de la pression d'aspiration, lorsque la surface est entièrement dépliée, accroître la succion a pour effet d'étirer la membrane, en diminuant la densité de surface des molécules tensioactives (Fa, 2003 ; Hisette-Jourdain, 2007). Ainsi, la technique permet de mesurer successivement les modules de courbure puis d'élasticité de la membrane, lorsque la pression d'aspiration est augmentée progressivement.

Il existe à la fin, une valeur maximale de la pression d'aspiration pour laquelle la vésicule soumise à une tension trop importante se rompt (Fa, 2003).

Pour réussir cette étude, il est très important d'avoir tout au début de l'expérience, une pression zéro à l'intérieur de la micropipette. Ceci permet à la vésicule choisie, d'être immobile au bout de la micropipette.

Ceci est possible si et seulement si la hauteur de l'eau dans la colonne d'eau est au même niveau que la cellule contenant les vésicules à analyser.

Le mode d'observation choisi est le contraste interférentiel différentiel (DIC) qui fournit une très bonne visualisation des contours de la vésicule, et donc permet de mesurer précisément la longueur aspirée  $L$  (Figure 46).

Pour permettre une analyse correcte, un certain nombre de conditions expérimentales doivent être remplies.

- Le volume intérieur de la vésicule reste constant : la bicouche lipidique n'est pas imperméable, mais les échanges d'eau entre le milieu intérieur et le milieu extérieur sont contrôlés par l'égalité de la pression osmotique dans les deux milieux (Fa, 2003). Nous nous assurons de cette égalité au moment de la formation des vésicules, grâce à la mesure précise, au moyen d'un osmomètre, de la pression osmotique des solutions de sucrose et de glucose qui composent respectivement le milieu interne et externe de la vésicule
- Il n'y a pas de perte ni d'ajout de matière au cours de l'expérience car le nombre de molécules lipidiques qui composent la bicouche est fixé.
- La partie de la vésicule aspirée dans la micropipette est cylindrique et se termine par une calotte sphérique. La forme en calotte sphérique est obtenue si et seulement si la membrane ne présente pas d'interaction adhésive avec la paroi de verre du capillaire.
- La température est maintenue constante (température ambiante) car les propriétés d'une membrane varient avec la température.

### **1.2.3. Calcul des grandeurs caractéristiques de la membrane**

L'expérience de succion permet de mesurer pour chaque valeur de la pression d'aspiration  $P_i$  imposée, les paramètres géométriques  $L$  et  $R$  de la vésicule (Figure 46). Ce qui veut dire la longueur aspirée et son rayon externe. La tension latérale de la membrane peut être calculée et l'aire apparente de la vésicule mesurée par traitement des images, on peut alors calculer le module de courbure  $K_c$  de la membrane.

#### **Calcul de la tension de la membrane**

Du point de vue mathématique, la tension de la membrane est identique à la tension de surface d'une goutte de lipide. La différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur de la vésicule est reliée à la tension  $\sigma$  de la membrane par la loi de Laplace. Si  $p$  est la pression qui règne dans la vésicule, on écrit deux fois l'équation de Laplace.

Pour la partie de la vésicule à l'intérieur de la micropipette :

$$p - p_i = \frac{2\sigma}{r} \quad (2.1)$$

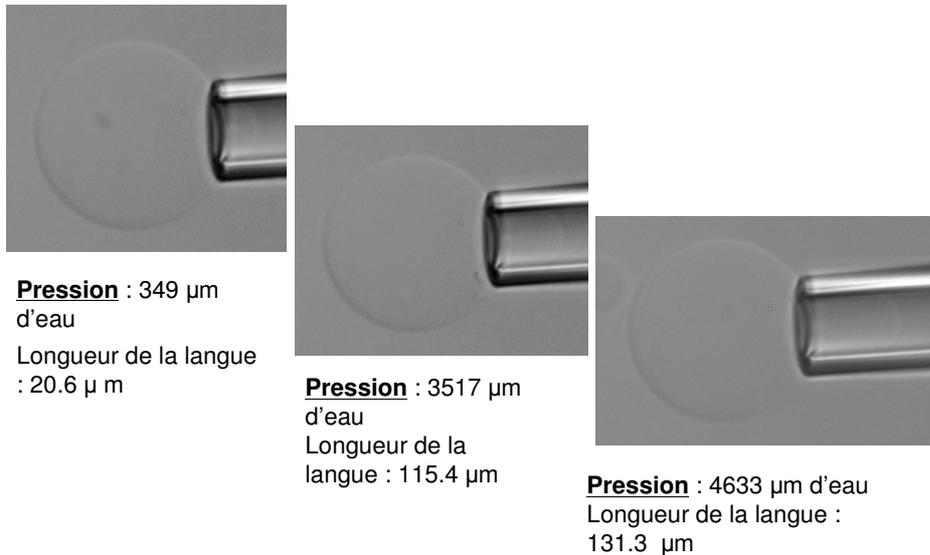
et pour la partie à l'extérieur de la micropipette :

$$p - p_e = \frac{2\sigma}{R} \quad (2.2)$$

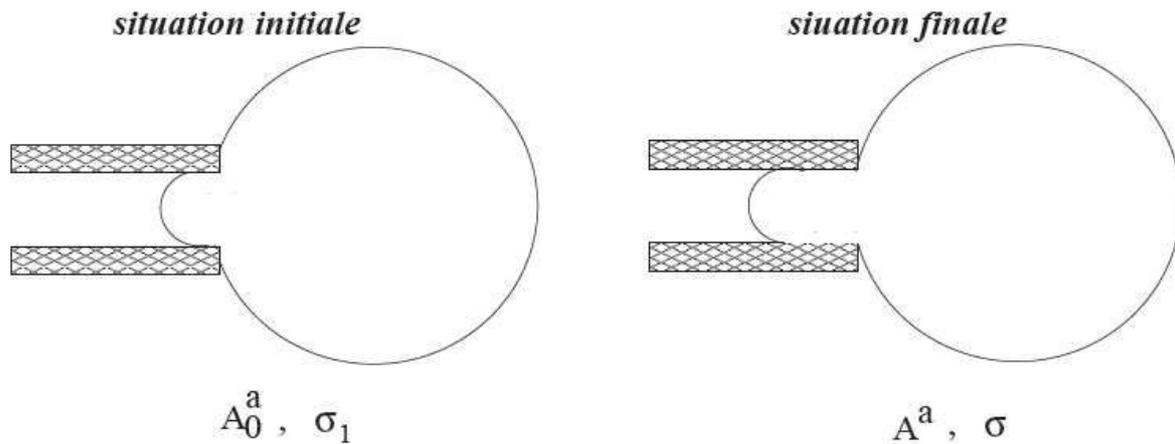
En posant  $\Delta P = p_e - p_i$ , on a :

$$\sigma = \frac{\Delta P}{2} \frac{r}{1 - \frac{r}{R}} \quad (2.3)$$

On peut voir sur la figure 47a, les valeurs de pression  $P_i$  exprimée en hauteur d'eau (micromètres) pour 3 états d'aspiration d'une vésicule soumise à une expérience de suction.



**Figure 47a : Vésicules de DOPC soumises à des tensions différentes**



**Figure 47b : Schéma de déroulement d'une expérience d'aspiration**

### **Taux d'augmentation de la surface apparente**

La relation d'Helfrich permet d'extraire le module de courbure d'une membrane si l'on connaît la variation d'excès de surface d'une vésicule avec la tension appliquée.

C'est une relation constitutive reliant la fraction de surface consommée par les modes de déformation de courbure et la tension de la membrane.

Au départ, la vésicule n'est pas aspirée, elle est de forme apparente sphérique (avec des ondulations) et son aire apparente est donnée par la formule :

$$A_0^a = 4\pi R_0^2 \quad (2.4)$$

Lorsque la vésicule est aspirée dans la micropipette (Figure 47a), sa surface apparente  $A^a$  s'écrit comme la somme des surfaces des parties de la vésicule situées à l'extérieur et à l'intérieur de la micropipette. La partie externe est assimilée à une sphère tronquée de surface  $A_{\text{ext}}^a$  et la partie interne, est notée  $A_{\text{int}}^a$  est considérée comme la somme d'un cylindre et d'une calotte sphérique de rayon  $r$ .

$$A^a = 2 \pi R^2 \left[ 1 + \sqrt{1 - \left( \frac{r}{R} \right)^2} \right] + 2 \pi r (L - R) + 2 \pi r^2 \quad (2.5)$$

$$A^a = 2 \pi R^2 \left[ 1 + \sqrt{1 - \left( \frac{r}{R} \right)^2} \right] + 2 \pi r L \quad (2.6)$$

Dans nos expériences, le diamètre  $r$  de la micropipette est de l'ordre de  $R/4$ . En négligeant les termes du deuxième ordre en  $(r/R)$ , l'expression précédente peut être simplifiée. Il vient :

$$A^a = 4 \pi R^2 + 2 \pi L r - \pi r^2 \quad (2.7)$$

Cette approximation revient à supposer que la surface externe à la micropipette  $A_{\text{ext}}$ , est la surface de la sphère de rayon  $R$  diminuée de la surface de la base du cylindre que forme la pipette. Le volume  $V$  de la vésicule est quant à lui supposé inchangé tout au long de l'expérience (cf. paragraphe précédent). On a :

$$V = V_0 = \frac{4}{3} \pi R_0^3 \quad (2.8)$$

Et  $R_0$  est le rayon apparent de la vésicule libre. Lorsque la vésicule est aspirée, le même volume  $V$  peut être défini comme la somme de trois termes, correspondant respectivement à une sphère de rayon  $R$ , tronquée du volume de la calotte déjà citée, un cylindre de longueur  $(L - r)$  et de diamètre  $r$ , et d'une demi-sphère de rayon  $r$ . Pour les mêmes raisons, on peut ignorer l'existence du volume de la calotte sphérique. Ainsi, on exprime le volume de la vésicule aspirée, surestimé du volume de cette calotte :

$$V = \frac{4}{3} \pi R^3 + \pi r^2 (L - r) + \frac{2}{3} \pi r^3 \quad (2.9)$$

Le module de courbure  $Kc$  est relié à la surface vraie  $A$ , que l'on ne sait pas mesurer. Pour contourner ce problème, Evans a exprimé l'incrément relatif de surface apparente en fonction de la pression d'aspiration, par rapport à un état de référence correctement choisi. On obtient ainsi  $Kc$  avec une excellente approximation.

On définit  $\alpha$  comme l'incrément relatif de surface apparente entre deux états de pression d'aspiration  $p_1$  et  $p_2$  donnés (avec  $p_1 < p_2$ ) :

$$\alpha = \frac{A_2^a - A_1^a}{A_1^a} \quad (2.10)$$

En introduisant la surface vraie  $A$  dans l'équation ci-dessus, on fait apparaître l'équation d'Helfrich :

$$\alpha = \frac{\frac{A}{A_1^a} - \frac{A}{A_2^a}}{\frac{A}{A_2^a}} = \frac{\frac{kBT}{8\pi kc} \ln \frac{\sigma_2}{\sigma_1}}{1 + \frac{kBT}{8\pi kc} \ln \frac{\sigma_{\max}}{\sigma_2}} \quad (2.11)$$

où,

$A_i^a$  est l'aire apparente pour la pression d'aspiration  $p_i$

$Kc$ - module de courbure

$kB$ - constante de Boltzman

$\sigma$  - tension de membrane

$T$ - température en °K

La tension de membrane d'une vésicule de phospholipide aspirée mais encore fluctuante, se situe entre  $10^{-7} - 10^{-5} \text{ N.m}^{-1}$  ; le dénominateur dans l'équation (2.11) est proche de l'unité, à typiquement 2% près. Ainsi dans l'équation ci-dessous, on néglige la correction du dénominateur, et l'on obtient une relation directe entre le module de courbure  $Kc$  et l'incrément relatif de surface apparente  $\alpha$ . Dans la pratique, on définit un état de succion de référence, que l'on choisit comme "l'état minimal" d'aspiration, obtenu pour une pression d'aspiration la plus faible possible, qui permet néanmoins la mesure d'une longueur aspirée  $L_0$  dans la micropipette. La relation devient alors :

$$a = \frac{A^a - A_{L_0}^a}{A_{L_0}^a} = \frac{kBT}{8\pi kc} \ln \frac{\sigma}{\sigma_{L_0}} \quad (2.12)$$

On exprime  $\alpha$  en fonction des paramètres géométriques de l'expérience. On a :

$$a = \frac{4\pi(R^2 - R_{L_0}^2) + 2\pi r(L - L_0)}{4\pi R_{L_0}^2} = \left(\frac{R}{R_{L_0}}\right)^2 - 1 + \frac{1}{2} \frac{r}{R_{L_0}^2} \Delta L \quad (2.13)$$

En reprenant l'équation de conservation du volume (2.9), on a :

$$R = \left( R_0^3 - \frac{3}{4} r^2 L + \frac{1}{2} r^3 \right)^{\frac{1}{3}} \quad (2.14)$$

Soit encore :

$$(R^3 - R_{L_0}^3) = -\frac{3}{4} r^2 \Delta L \quad (2.15)$$

En développant au premier ordre  $\Delta L$  :

$$\left(\frac{R}{R_{L_0}}\right)^2 = 1 - \frac{1}{2} \frac{r^2}{R_{L_0}^3} \Delta L \quad (2.16)$$

Finalement l'expression 2.13 s'écrit :

$$\alpha = \frac{1}{2} \frac{r}{R_{L_0}^2} \Delta L \left( 1 - \frac{r}{R_{L_0}} \right) \quad (2.17)$$

## 2. Résultats

### 2.1. Etude des propriétés élastiques des vésicules de DOPC par la technique de micropipette

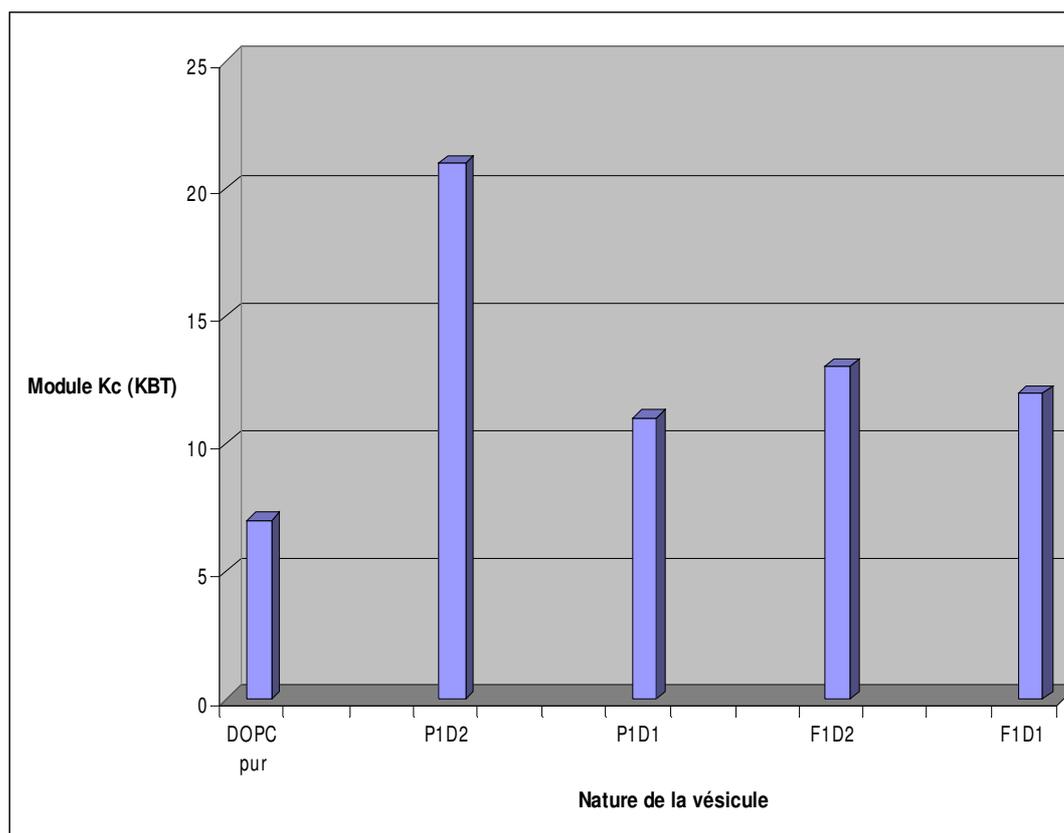
Nous avons réalisé l'expérience d'aspiration sur un grand nombre de vésicules (28). Pour chacune d'elles, nous appliquons une dizaine de pas successifs d'aspiration et enregistrons une série d'images de la vésicule ainsi aspirée. Puis le traitement d'images nous permet de tracer la courbe de l'allongement  $\Delta L$  de la vésicule en fonction des valeurs de pression  $P$  imposées.

Nous avons réalisé des expériences de référence avec des vésicules de DOPC, puis avec des vésicules mixtes DOPC-polluant. L'ensemble des résultats est résumé dans la figure 48.

On constate que la présence de polluant dans la membrane augmente légèrement la rigidité de la membrane. Cette rigidité varie d'un polluant à un autre. Dans nos expériences la rigidité est accentuée surtout en présence de pyrène pour lequel on a 21 kBT pour la concentration d'une molécule de pyrène pour 2 molécules de DOPC ; 11 kBT pour 1 molécule de pyrène pour 1 molécule de phospholipide, 13 kBT et 12 kBT respectivement pour 1 ou deux molécules de fluoranthène pour 1 ou 2 molécules de phospholipide.

Quant au DOPC sans polluant, son module d'élasticité est de 7 kBT.

Notons que pour chaque expérience le module de courbure varie d'une vésicule à une autre et est compris 6.0 kBT et 14.0 kBT pour le DOPC sans polluant, de 8,5 à 30.0 kBT pour les vésicules de DOPC + pyrène et de 5,6 à 22.0 kBT pour les vésicules de DOPC + fluoranthène. Ainsi, la dispersion des mesures reste très importante, comme c'est souvent le cas dans ce type de systèmes, mais il apparaît toutefois qu'en moyenne, l'accumulation de polluant dans les membranes modèles de DOPC conduit à une augmentation de leur module de courbure  $K_c$ .



**Figure 48** : Histogrammes de comparaison des modules de courbure  $k_c$

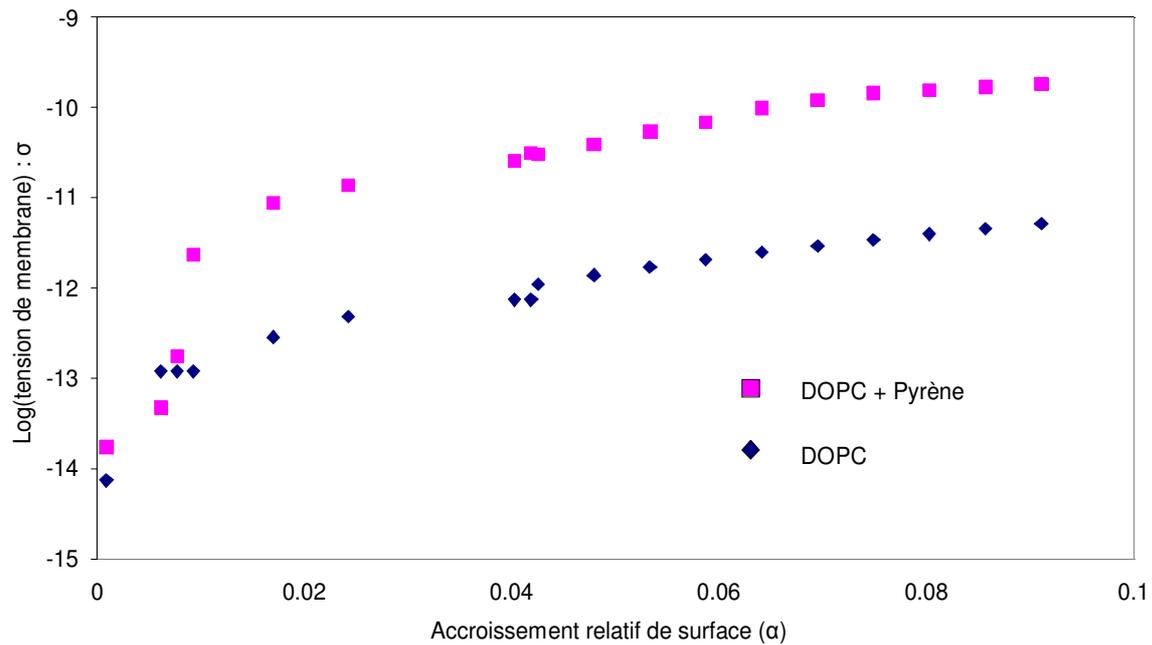
Où:

P1D2 - 1 molécule de pyrène pour 2 molécules de DOPC

P1D1 - 1 molécule de pyrène pour 1 molécule de DOPC

F1D2 - 1 molécule de fluoranthène pour 2 molécules de DOPC

F1D1 - 1 molécule de fluoranthène pour 1 molécule de DOPC



**Figure 49** : Expérience de micropipette : deux courbes typiques d'étirement des vésicules de DOPC sans et avec pyrène. Ces deux courbes sont qualitativement très semblables, et seule l'analyse statistique permet d'observer une augmentation moyenne du module de courbure des vésicules polluées.

### 3. Conclusion

L'étude statistique effectuée sur vingt-huit vésicules de DOPC sans ou avec polluants, a montré que les vésicules de DOPC polluées ont un module de courbure sensiblement plus élevé que les vésicules de DOPC pur.

## Partie 3

### Effet membranaire

#### C. Titration calorimétrique isotherme

La titration calorimétrique isotherme ou *Isothermal Titration Calorimetry* (ITC) est une technique permettant l'étude d'interactions de toutes sortes, se produisant lors du mélange à température constante et régulée de deux solutions. Elle se base sur le fait que toute interaction libère ou absorbe une certaine quantité d'énergie. L'appareil mesure ainsi une énergie qui est la somme des contributions provenant de mécanismes tel que l'ionisation des molécules, les changements conformationnels, l'agrégation... (O'Brien et *al.*, 2000). L'utilisation de cette technique couplée à un logiciel adéquat permet de calculer, entre autres, la constante d'association ( $K_a$ ) ou de dissociation ( $K_d$ ), la stoechiométrie, l'enthalpie ( $\Delta H$ ), l'entropie ( $\Delta S$ ) de mélange d'un échantillon et l'énergie libre de Gibbs ( $\Delta G$ ).

Les microcalorimètres modernes sont des outils permettant de mesurer des quantités de chaleur de l'ordre de 1  $\mu\text{cal}$  (Gueye et *al.*, 2007). Ils sont donc particulièrement adaptés à l'étude physico-chimique d'interactions biologiques mettant en jeu la formation de liaisons non-covalentes comme les liaisons hydrogènes. Plus généralement, ils permettent de quantifier les effets thermiques pouvant accompagner les changements de conformation que subissent de nombreuses molécules biologiques dans le cadre de leur fonction physiologique (Gueye et *al.*, 2007). Ces performances, alliées à une gestion automatisée de l'expérimentation et du traitement des résultats, font que la microcalorimétrie occupe une place de plus en plus importante en biologie. Il faut cependant noter les contraintes expérimentales sévères pour l'obtention de résultats reproductibles et fiables : dégazage poussé des solutions, nettoyage parfait de la cellule de mesure et de la seringue d'injection, et enfin équilibration longue en température de l'ensemble du dispositif avant toute mesure. Toutes ces contraintes font qu'il est difficile de réaliser plus de trois mesures par jour.

A titre d'exemple historique, Kitzinger a pu, grâce à cet instrument, mesurer la chaleur de réaction lors de l'interaction de l'albumine avec un anticorps dirigé contre cette protéine (Kitzinger et Steiner, 1956).

## 1. Principe de la titration calorimétrique isotherme

Le principe de la calorimétrie isotherme à titration est le suivant : une macromolécule située dans la cellule de mesure d'un calorimètre isotherme est progressivement saturée, à température constante, par l'injection d'aliqots d'un ligand à partir d'une seringue. A chaque ajout de ligand correspond un échange thermique signant l'interaction macromolécule-ligand, signal proportionnel à la quantité de complexe formé. Les quantités de chaleur mesurées permettent d'obtenir l'isotherme de liaison, et les paramètres de l'interaction sont déterminés au moyen de modèles proposés par le logiciel de traitement des résultats.

Le principe même de la méthode et la sensibilité de l'appareillage permettent d'étudier une interaction avec une quantité minime de réactifs. Typiquement, en supposant une énergie d'interaction de l'ordre de 10 kJ par mole, et une sensibilité de détection de quelques micro-Joules, il est conseillé de travailler avec des solutions de réactifs de concentration supérieure à 0.1 mM par litre.

## 2. Les liposomes

Les lipides appartiennent à une famille particulière de molécules amphiphiles qui possèdent une tête polaire, donc hydrophile, chargée ou non, et au moins une chaîne aliphatique, hydrophobe (Schechter, E., 1993). Lorsqu'ils sont mis en solution aqueuse, ces composés amphiphiles, vont dans un premier temps se positionner aux interfaces, comme à l'interface eau-air : la partie hydrophile du composé amphiphile est solubilisée dans l'eau tandis que la partie hydrophobe est exposé à l'air. Lorsque la concentration en molécules amphiphiles est augmentée jusqu'à saturation de l'interface eau-air par une monocouche adsorbée, des molécules individuelles restent en solution. Cependant, si ces molécules restaient solubilisées de façon individuelle, cette situation serait très coûteuse en énergie libre car les parties hydrophobes de la molécule seraient alors exposées à l'eau. Afin de minimiser l'énergie libre du système, un auto-assemblage des molécules individuelles a lieu. Cet auto-assemblage peut être à l'origine de nombreuses phases de morphologie différentes (Partie 3, point 1.4)

Les liposomes, obtenus à partir de molécules amphiphiles naturelles (phospholipides par exemple), et les niosomes, composés de molécules amphiphiles synthétiques non-ioniques (alkyl éthers de polyglycérols par exemple) sont des structures microscopiques (1,025 à plusieurs microns) constituées d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques séparées par des compartiments aqueux (Bangham A.D. et *al.*, (1965) qui s'apparentent à la structure lamellaire du ciment intercornéocyttaire de la peau.

### **3. Matériels et méthodes**

#### **3.1. Matériels**

##### **3.1.1. Matériel pour la fabrication des liposomes**

- Le phospholipide utilisé dans cette étude est le 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC, 99%, Sigma-Aldrich).
- Les polluants utilisés sont le pyrène et le fluoranthène (Sigma-Aldrich)
- Le solvant utilisé pour la dilution des polluants est le dichlorométhane (Sigma-Aldrich)
- L'extrudeur (Avanti Polar Lipids, Inc)
- Les supports de filtres (Avanti Polar Lipids, Inc)
- Les filtres (Avanti Polar Lipids, Inc)
- Les micro-seringues de 100 et 250  $\mu\text{L}$  (Hamilton Co, Etats-Unis).

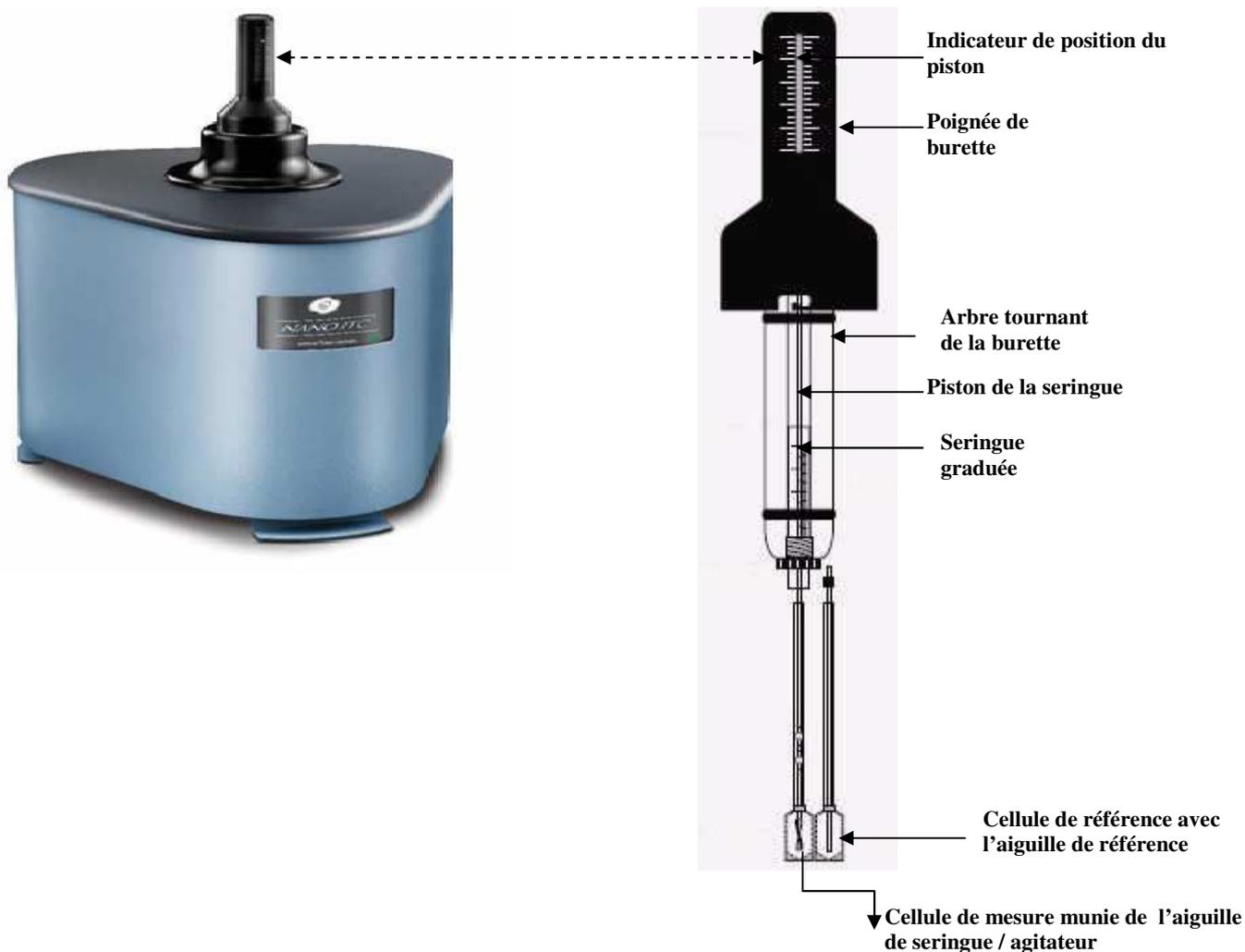
##### **3.1.2. Matériel pour la caractérisation des liposomes**

- Le Zêtasizer Nano ZS (Malvern Instruments Co, Grande-Bretagne)

##### **3.1.3. Matériels de l'ITC**

Le dispositif de l'ITC comprend :

- L'appareil de dégazage (TA Instruments, Etats-Unis)
- Le microcalorimètre (Microcalorimetry Compendium Vol II, TA Instruments, Etats-Unis).



**Figure 50 :**

- a. Vue générale du microcalorimètre
- b. Vue interne du microcalorimètre

Le dispositif de calorimétrie de titration isotherme (ITC pour Isothermal Titration Calorimetry) représenté sur la figure 50, est un microcalorimètre de la marque TA Instruments. Il est constitué de deux cellules de 1400  $\mu\text{L}$ , la cellule de mesure et la cellule de référence, situées au coeur de l'appareil, dans une enceinte à l'isolation thermique très élaborée, munie d'un dispositif de régulation thermique permettant de contrôler à  $10^{-4}$  degrés près la différence de température entre ces deux cellules, et de mesurer la chaleur nécessaire au maintien de cet équilibre thermique. Une seringue placée dans la partie supérieure de l'appareil contient la solution titrante qui va être injectée dans la cellule de mesure, par étapes contrôlées. L'aiguille de la seringue comporte une pale d'agitation pour accélérer le mélange et donc la réaction entre les réactifs mis en présence.

## **3.2. Méthodes**

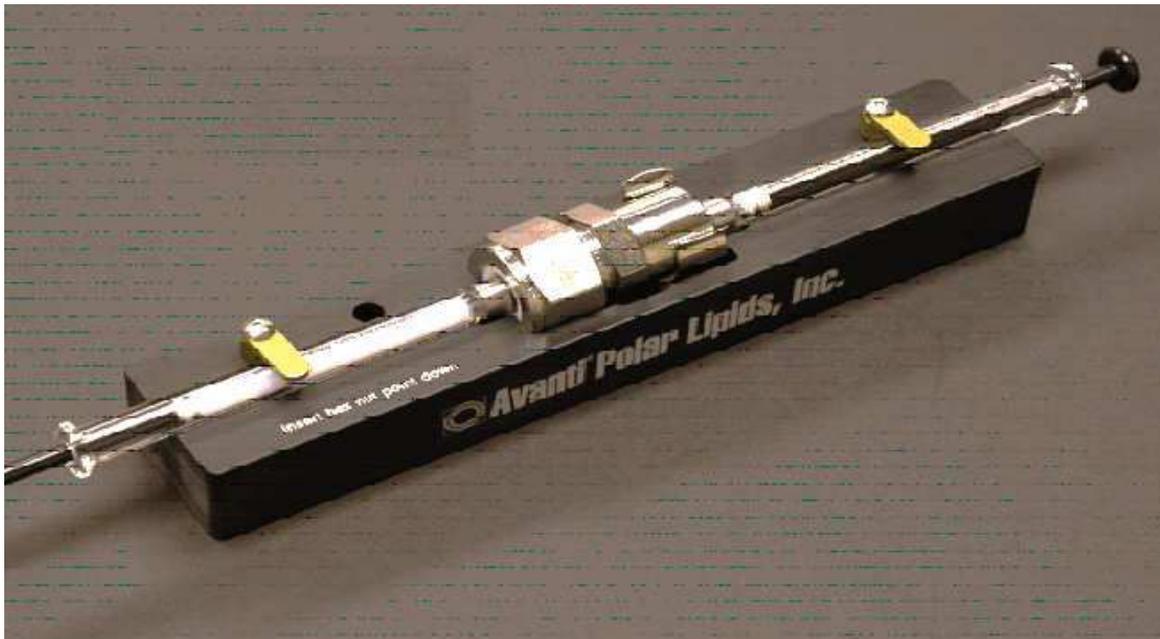
### **3.2.1. Préparation des liposomes**

Dans cette partie nous décrivons nos expériences de titration calorimétrique obtenues en mélangeant diverses solutions de liposomes avec des solutions aqueuses pouvant contenir du polluant. La technique de fabrication et de caractérisation des liposomes est décrite ici. Les liposomes peuvent être pur (DOPC) ou bien réalisés à partir de mélanges DOPC + polluant. Dans ce dernier cas, comme pour la fabrication des vésicules géantes décrite plus haut, nous réalisons une solution de chloroforme contenant le mélange adéquat DOPC + polluant. Le mélange est en général une solution à 10mg/ml de DOPC. On prélève 300  $\mu$ L de cette solution que l'on dépose dans un ballon. On évapore le chloroforme sous vide au ROTAVAPOR pendant 30 à 60 minutes. Sur le film de DOPC formé au fond du ballon, on ajoute 2.7 mL d'eau milliQ pour avoir une solution à 1 mg/mL qu'on agite pendant une à deux heures pour à avoir une solution homogène. Cette solution est extrudée pour obtenir des liposomes unilamellaires, que l'on caractérise ensuite au zêtasizer.

### **3.2.2. Extrusion des liposomes de DOPC à travers des membranes poreuses calibrées (filtres)**

Les liposomes obtenus lors de la dispersion du film de lipides (ou du mélange lipide-polluant) sont en général des objets multilamellaires très polydispersés en taille. La phase d'extrusion permet de transformer ces liposomes en vésicules unilamellaires et monodispersées en taille. La technique consiste à passer plusieurs fois (11 à 16 passages) à travers une membrane poreuse calibrée la solution de liposomes précédente. On utilise pour cela une paire de seringues identiques de 250 microlitres ou 1 millilitre, suivant les besoins, qui sont connectées au corps de l'extrudeur, simple réceptacle contenant la membrane calibrée.

Il en résulte un dimensionnement des liposomes qui tend à se stabiliser après une dizaine de passages. Dans notre expérience nous avons utilisé des membranes de 100 nanomètres de porosité.



**Figure 51** : L'extrudeuse

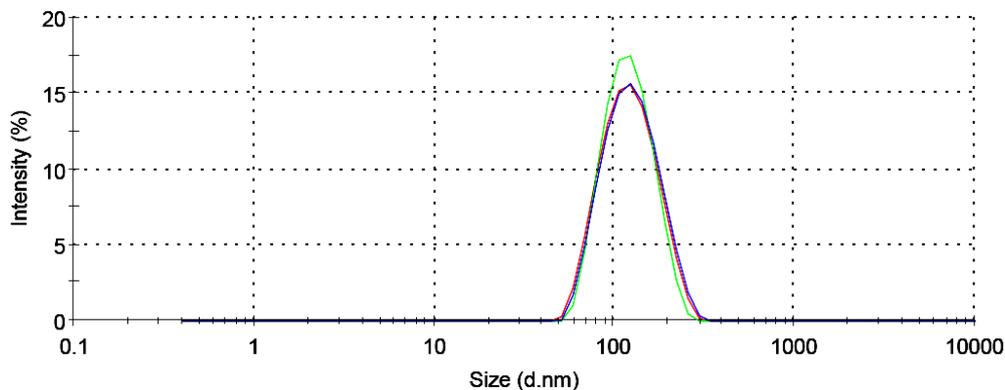
Nous faisons passer 250  $\mu\text{L}$  de solution de phospholipide dans deux seringues identiques par des mouvements de va et vient. Ces seringues sont fortement insérées le long d'un conduit creusé dans le support de l'extrudeuse. L'une sert de seringue de prélèvement et l'autre de seringue de réception. On exerce une pression manuelle sur les liposomes en les poussant d'une seringue à une autre pendant 11 à 16 passages. Les liposomes calibrés sont recueillis dans la seringue de réception.

On détermine la taille des liposomes ainsi obtenus, grâce à l'appareil Zetasizer Nano ZS.



**Figure 52** : Le Zétasizer Nano ZS (Malvern Instruments Co, Grande-Bretagne)

Le Zétasizer Nano ZS mesure la taille des particules dans un liquide jusqu'à moins d'un nanomètre en observant le mouvement thermique ou mouvement Brownien des particules. La taille des particules est mesurée en analysant les fluctuations d'intensité de la lumière diffusée, à partir de la relation de Stokes-Einstein, qui relie la taille des objets diffusants, la viscosité du fluide et le temps caractéristique de fluctuations de l'intensité lumineuse. Cette méthode est appelée diffusion dynamique de la lumière. La figure suivante montre une dispersion typique de la taille des liposomes après extrusion.



**Figure 53** : Répartition des tailles des liposomes

### 3.3. Types d'expériences réalisées

Nous avons préparé des liposomes de DOPC pur, et des liposomes mixte DOPC-polluant en mélangeant les solutions mère de DOPC et de polluant de façon similaire à ce qui a été réalisé pour les vésicules géantes. Les concentrations relatives polluant-phospholipide de 1:1 et 1:2 ont été réalisées. Les liposomes ont été extrudés comme décrit ci-dessus.

Toutes les solutions (eau milliQ, liposomes, solutions de polluants) sont dégazées sous vide (600 mm Hg) dans l'appareil de dégazage pendant 15 minutes à 25°C avant leur utilisation, condition nécessaire pour réaliser une expérience propre de titration.

#### 3.3.1. Injection de liposomes mélangés avec du polluant dans l'eau

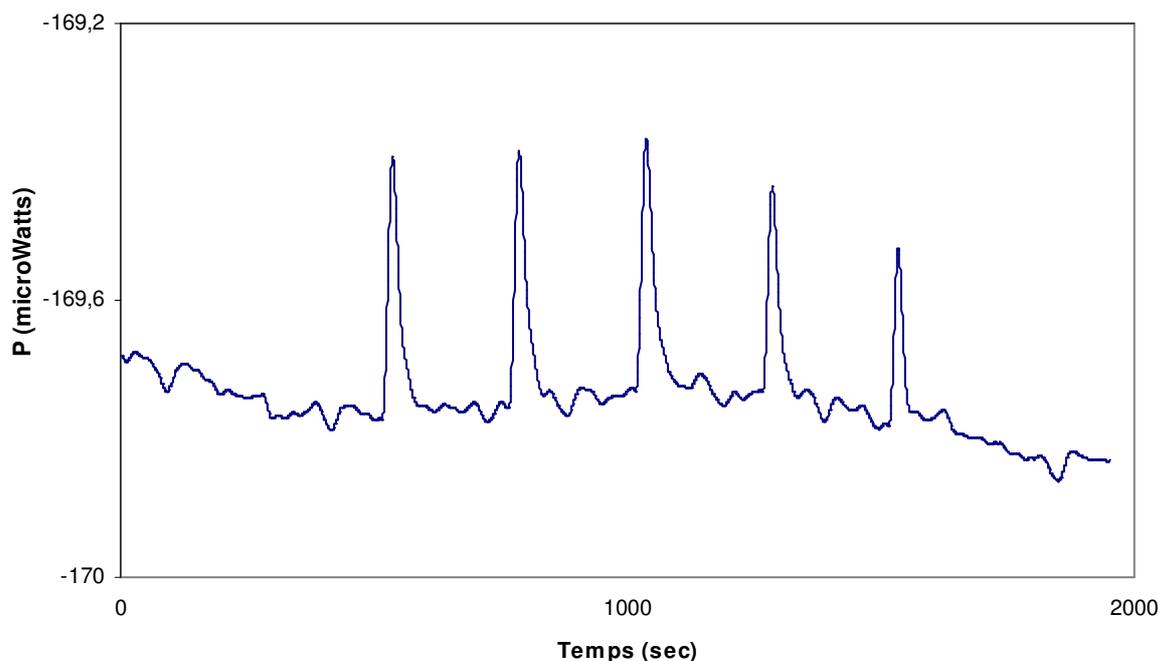
Lors de cette expérience, la cellule de mesure contient de l'eau milliQ et la seringue contient des liposomes obtenus à partir d'un mélange initial de DOPC et de polluant. On mesure ainsi la chaleur de dilution de liposomes pollués.

#### 3.3.2. Injection de liposomes de DOPC dans une solution de polluant.

Au cours de cette expérience, la cellule de mesure contient une solution de polluant en concentration de saturation. La seringue contient les liposomes de DOPC purs. On mesure ainsi la chaleur de mélange de liposomes de DOPC dans une solution aqueuse contenant le polluant.

#### 4. Résultats

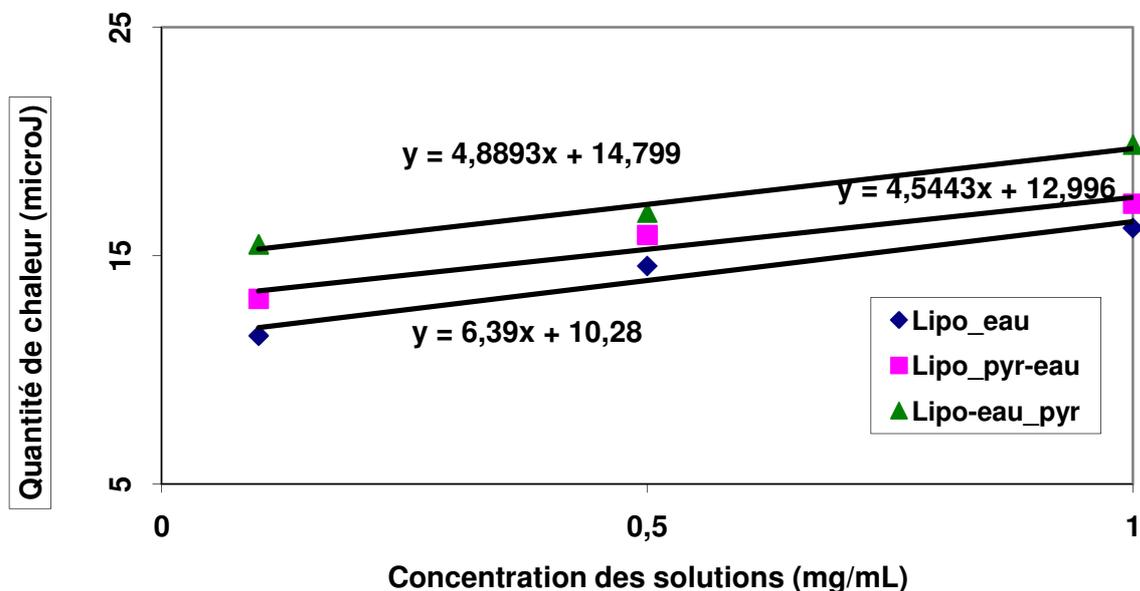
Toutes les expériences de titration que nous avons effectuées présentent des pics exothermiques. La mesure de la chaleur dégagée lors du mélange s'obtient à partir du calcul de l'aire sous la courbe de la figure 54, qui montre la puissance dépensée par l'appareil au cours du temps pour maintenir la différence de température constante entre la cellule de référence et la cellule de mesure, dans laquelle se produit le mélange. Il faut noter que les valeurs mesurées de chaleur de réaction sont très proches entre elles pour toutes les configurations testées dans cette étude : dilution de liposomes de DOPC dans l'eau, dilution de liposomes chargés en polluant dans l'eau, et dilution de liposomes de DOPC dans l'eau chargée en polluant.



**Figure 54 :** Allure typique des courbes d'IITC, obtenues en injectant 10 microlitres de solution dans la cellule de mesure.

La figure 55 résume les résultats obtenus; pour trois concentrations de phospholipide par unité de volume (0.1, 0.5, et 1.0 mg/ml). Nous constatons d'une part que la chaleur de réaction augmente avec la fraction en liposomes, et d'autre part qu'il y a apparemment une différence entre les chaleurs dégagées dans les différentes configurations expérimentales.

Ainsi, la chaleur dégagée lors du mélange de liposomes de DOPC dans une solution saturée en pyrène semble supérieure à la chaleur dégagée lors du mélange de liposomes mixtes DOPC-pyrène dans une solution d'eau, elle même supérieure à la chaleur dégagée lors de la dilution de liposomes de DOPC dans l'eau. Malheureusement ces différences sont minimales et de l'ordre de la résolution expérimentale. Il paraît difficile de tirer des conclusions quantitatives de cette étude. En théorie, connaissant les concentrations en liposome et en polluant il serait possible d'estimer les chaleurs de réaction par molécule. Ainsi, on constate que pour la concentration de 1mg/ml, les différences observées entre les différentes configurations sont de l'ordre de 1µJ. Cette grandeur est une moyenne des chaleurs dégagées lors de chaque injection, correspondant dans notre cas à 10µl de solution injectée. On observe donc une chaleur dégagée de l'ordre de 100 Joules par mole de lipide. Dans le cas de l'injection de liposomes mixtes DOPC-pyrène par exemple, la fraction molaire de polluant est comparable à la fraction molaire de DOPC dans la membrane. On mesure donc une chaleur de réaction de l'ordre de 100J/mole, correspondant à une petite fraction de  $k_B T$  par molécule, ce qui ne peut être raisonnablement mesuré avec cet appareil. Le même raisonnement peut s'appliquer au cas de la dissolution de liposomes dans une solution aqueuse saturée en pyrène.



**Figure 55** : Résultats obtenus après injection des liposomes dans des différentes solutions de pyrène et de l'eau.

## **5. Conclusion**

La dilution de liposomes de DOPC est une réaction exothermique, et la dilution de liposomes mixtes DOPC-polluant ou de liposomes de DOPC dans une solution aqueuse de polluant conserve cette propriété. Mais l'excès de chaleur dégagée, due à la présence de polluant dans la membrane ne peut raisonnablement être mesurée, et nous préférons ne pas tirer de conclusion au vu cette étude.

## Discussion-Conclusion

Les objectifs de ce travail étaient d'étudier les interactions polluants (HAP)-récepteurs adrénergiques dans le tissu adipeux.

Il s'agissait de vérifier l'hypothèse selon laquelle dans le cas d'une obésité liée à la pollution alimentaire ou environnementale, les polluants (HAP) empêcheraient la lipolyse des triglycérides dans le tissu adipeux.

Notre travail a été essentiellement expérimental et a nécessité la mise en œuvre de nombreuses techniques de mesure (réceptologie, électroformation de membranes modèles, microscopie, technique de micropipette et titration calorimétrique isotherme).

**Concernant la réceptologie**, les principaux résultats obtenus montrent que:

- l'addition de BaP à des concentrations de  $10^{-10}$  et de  $10^{-8}$  M ne provoque aucune inhibition de liaison de contrôle. Le BaP ne semble pas se fixer directement au récepteur adrénergique.

### Trois séries d'exploration ont été menées :

#### **- Etude in vitro de liaison « binding » des récepteurs $\beta_3$ en présence de benzo[a]pyrène**

Le récepteur utilisé (réf cellules SK-NC d'origine endogène), le ligand (CYP marqué à l'iode 125 dans du propanolol ( $1\mu\text{M}$ ) et les conditions d'incubation et de détermination sont identiques à la méthode de Curran et Fahman, 1996. La liaison (« binding ») spécifique aux récepteurs est définie comme la différence entre le total « binding » et le «non spécifique binding» déterminée en présence de benzo[a]pyrène.

#### **- Etude in vitro de l'effet benzo[a]pyrène sur l'activité des récepteurs $\beta_1$**

Le récepteur utilisé est un recombinant humain (référence HEK -293 cellules) Curran et Fahman, 1996. La stimulation par l'isoproterenol ( $1\text{nM}$ ) en incubation (30 min à  $22^\circ\text{C}$ ) induit des modifications de concentration en AMPc suivie par une méthode de fluorescence (méthode HTRF). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la réponse de l'action de l'agoniste sur le récepteur.

### **- Etude in vitro de l'effet benzo[a]pyrène sur l'activité des récepteurs $\beta_3$**

Même protocole que précédemment sauf que le récepteur est le récepteur endogène non peptidique (réf SK N MC cells) : l'isoprotérénol stimulant est à la concentration de 5  $\mu\text{M}$  ; l'incubation est réalisée à 22°C pendant 10 min seulement.

Les analyses de liaison révèlent que le benzo[a]pyrène ne lie pas le  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  adrénergiques humains. Le pourcentage (%) en moyenne de l'activité spécifique de contrôle (n = 2) reste égal à 100% de l'activité spécifique de contrôle, quelle que soit le benzo[a]pyrène testé. Par conséquent, l'hypothèse selon laquelle l'inhibition de la lipolyse peut être due à une compétition entre le benzo[a]pyrène et  $\beta$ -agonistes, tels que les catécholamines pour lier le  $\beta$ -adrénergiques ne semble pas être pertinente. Cette observation tend à renforcer l'hypothèse selon laquelle le benzo[a]pyrène induirait une inhibition de la lipolyse par l'accumulation au niveau de la bicouche de phospholipides et des changements de conformation de la bicouche de phospholipides dans les environs des récepteurs à sept domaines transmembranaires qui sont  $\beta$ -adrénergiques. Pour tester cette hypothèse, un test fonctionnel a été réalisé sur cellules HEK-293 avec les récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques humains. Ce test a consisté à mesurer le niveau d'AMPC produit en présence de diverses concentrations de benzo[a]pyrène en utilisant isoprotérénol à 1 nM comme agoniste de contrôle pour générer un contrôle à 100 % de production d'AMPC.

Néanmoins une légère décroissance de production d'AMPC, indépendamment de la teneur de la concentration en benzo[a]pyrène a été observée. Sur plus de 16 AMPC mesurés, 11 ont été jugés en dessous de 100%, 3 égal à 100% et 2 ci-dessus de 100% de la production d'AMPC. Contrôle réalisé sans le benzo[a]pyrène. Ces résultats sont en conformité avec une perturbation du bon fonctionnement de la  $\beta_1$ -adrénergique en présence de benzo[a]pyrène, en raison que le benzo[a]pyrène induit des changements conformationnels de la bicouche de phospholipides dans les environs du récepteur.

Cette dernière observation a motivé une enquête fine de la bioaccumulation des HAP au niveau des bicouches phospholipidiques.

### **Concernant les membranes biomimétiques ou membranes modèles**

Nous avons utilisé deux méthodes d'investigation de l'accumulation des polluants aromatiques polycycliques (HAP) dans la membrane adipocytaire, en étudiant cette accumulation dans des membranes modèles. Dans ce but, nous avons utilisé des vésicules

géantes (GUVs) de DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine). Dans une première méthode, du pyrène ( $C_{16}H_{10}$ ) ou du fluoranthène ( $C_{16}H_{10}$ ), deux polluants HAP, ont été incorporés dans la membrane dès la fabrication des GUVs : nous avons testé des concentrations d'une ou deux molécules de polluant pour deux molécules de phospholipide. Dans une seconde configuration, nous avons introduit des GUVs de DOPC dans des solutions de glucose incorporant les polluants à des concentrations micromolaires, et nous avons mis en évidence une incorporation des polluants dans la membrane.

L'observation quantitative de la fluorescence des vésicules au moyen de la microscopie optique, nous a permis de calculer les concentrations de polluant dans les membranes dans cette seconde configuration. Cette concentration varie de 4 à 13% de polluant dans la membrane respectivement pour le pyrène et le fluoranthène.

L'expérience sur les membranes modèles de phospholipides (DOPC) a permis de confirmer les hypothèses de Jimenez et *al.* (2002). Hypothèses selon lesquelles les polluants s'accumulent au niveau des phospholipides de la membrane cellulaire et partant de la cellule adipeuse au bénéfice de leur caractère lipophile.

### **Concernant l'étude des propriétés élastiques des membranes modèles par la méthode de micropipette**

En comparant les constantes d'élasticité des vésicules de DOPC non polluées par rapport aux vésicules de DOPC polluées, on constate que la présence de polluant dans la membrane augmente légèrement la rigidité de la membrane. Cette rigidité varie d'un polluant à un autre. Dans nos expériences la rigidité est accentuée surtout en présence de pyrène pour lequel on a en moyenne, 21 kBT pour la concentration d'une molécule de pyrène pour 2 molécules de DOPC ; 11 kBT pour 1 molécule de pyrène pour 1 molécule de phospholipide, 13 kBT et 12 kBT respectivement pour 1 ou deux molécules de fluoranthène pour 1 ou 2 molécules de phospholipide. Quant au DOPC sans polluant, son module d'élasticité est en moyenne de 7 kBT.

### **Concernant l'étude de la titration calorimétrique isotherme (ITC)**

Nous avons obtenu pour 3 concentrations distinctes (0,1 ; 0,5 et 1 mg/mL) pour les liposomes injectés dans de l'eau une pente K de 6,39 tandis que pour les liposomes de mélange de

DOPC + pyrène injectés dans de l'eau milliQ (lipo-pyrène\_eau),  $K_1 = 4,54$ . Quant aux liposomes de DOPC injectés dans une solution de pyrène (lipo-eau\_pyrène),  $K_2 = 4,88$ .

La différence de pente est respectivement de :  $\Delta K_1 = 1,85$  ;  $\Delta K_2 = 1,51$ .

Ainsi nous pouvons dire que la liaison des liposomes avec les polluants est une réaction exothermique. Mais la chaleur dégagée est très faible.

Par rapport à l'hypothèse de départ, les résultats exprimés dans ce travail apportent la preuve que l'effet des polluants sur les mécanismes lipolytiques ne doit pas être recherché sur l'action directe du polluant sur la réactivité du récepteur par rapport à son ligand.

L'accumulation des polluants de type hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) est généralement recherchée dans la vésicule lipidique, eu égard à la lipophilie de ces substances aromatiques. Nos résultats sur l'accumulation des polluants dans les membranes de phospholipides confirment ainsi l'hypothèse de Jimenez *et al.* (2002).

## Annexes

### PCDD-F, PCB, HAP, HCB

#### Dioxines et furannes - PCDD-F

**Source :** CITEPA / CORALIE format SECTEN - mise à jour 23 février 2006

**Période d'observation :** depuis 1990

#### Emissions :

Emissions en 2004 : 310 g ITEQ

Maximum observé : 1 892 g ITEQ en 1993

Minimum observé : 246 g ITEQ en 2003

#### Evolutions :

Evolution 2004 / 1990 : -82 %

Evolution 2004 / maximum : -84 %

Evolution 2004 / minimum : +26 %

#### Sous-secteurs prépondérants en 2004 (cinq premiers des émissions totales) :

- 1 - Autres secteurs de la transformation d'énergie 52 %
- 2 - Traitement des déchets 16 %
- 3 - Métallurgie des métaux ferreux 16 %
- 4 - Résidentiel 10 %
- 5 - Métallurgie des métaux non-ferreux 2,1 %

#### Commentaires :

Les phénomènes complexes conduisant à la formation de dioxines et furannes se produisent dans des conditions particulières de combustion que l'on peut rencontrer dans tous les secteurs mais plus particulièrement au cours de l'incinération des déchets et de la production d'agglomérés pour les hauts-fourneaux, voire dans quelques autres procédés particuliers.

En 2004, les émissions de dioxines et furannes représentent 310 g ITEQ (équivalent toxique international). Depuis 1990, ces émissions sont en très forte baisse (-82% soit -1 455 g ITEQ). Cette diminution est observée dans l'ensemble des secteurs, en particulier grâce aux progrès réalisés dans les domaines de l'incinération des déchets et de la sidérurgie.

Toutefois, une légère hausse des émissions entre 2003 et 2004 est observée (+26% soit une augmentation de +64 g ITEQ) suite, en particulier, à un dysfonctionnement d'un des incinérateurs avec récupération d'énergie fermé depuis.

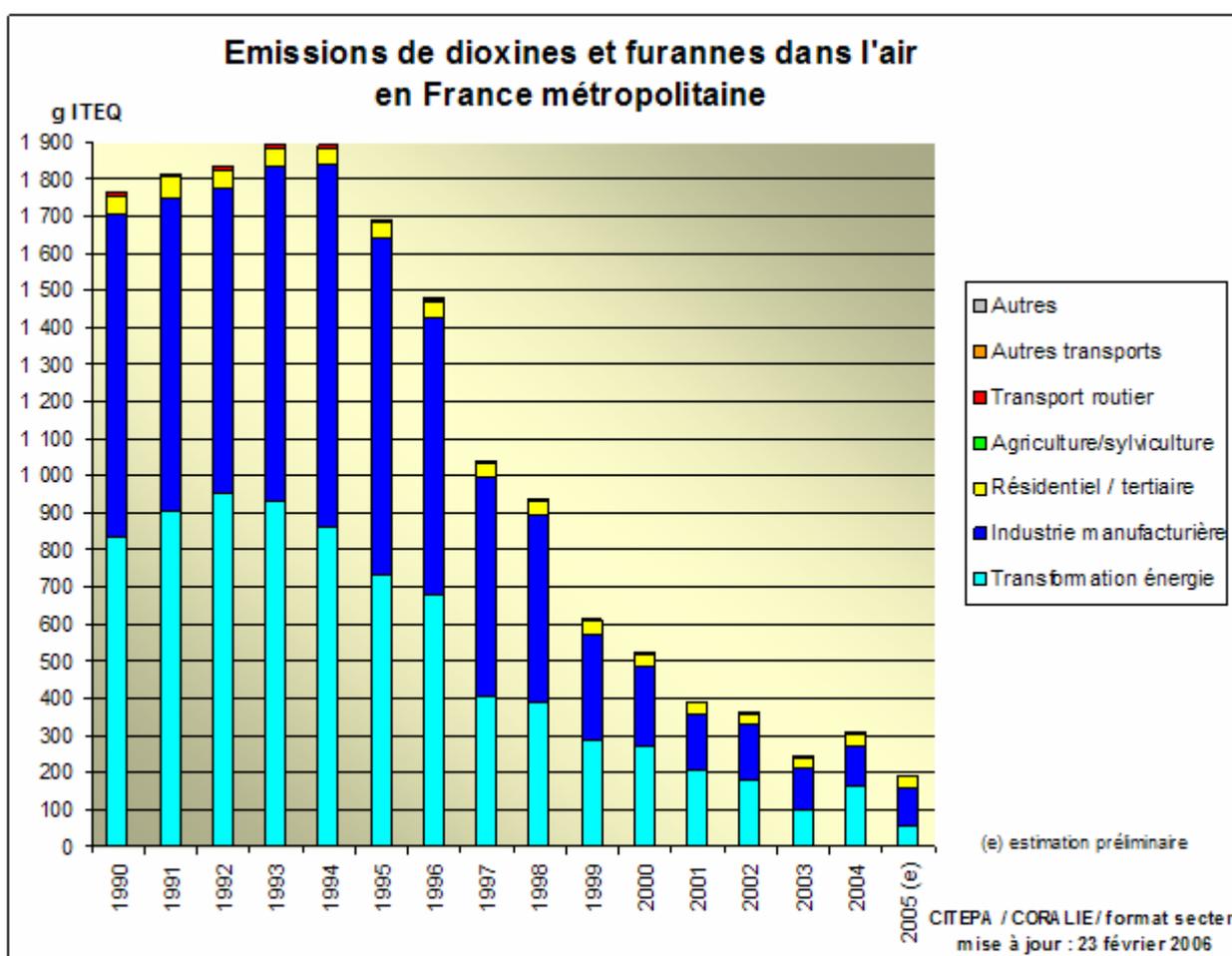
Les secteurs qui contribuent principalement aux émissions de PCDD-F en 2004 sont : la transformation de l'énergie (53%), l'industrie manufacturière (35%) et le résidentiel/tertiaire (10%). Les autres secteurs ont une contribution limitée (moins de 1%), voire nulle, comme dans le cas du secteur "autres".

La majeure partie des émissions issues de la transformation de l'énergie est engendrée par l'incinération des déchets avec récupération d'énergie (98% des émissions de ce secteur en

2004). L'incinération des déchets sans récupération d'énergie, rattachée à l'industrie manufacturière, représente moins de 10% des émissions de ce dernier secteur en 2004 alors qu'il en représentait 76% en 1990. Cette baisse fait suite aux progrès réalisés mais surtout au développement depuis 1990 de la récupération d'énergie passé de 69% à 96% des quantités incinérées sur la période.

Les progrès réalisés dans le secteur de la métallurgie des métaux ferreux, particulièrement pour la production d'agglomérés, ont permis de réduire les émissions propres à ce secteur de 87% de 1990 à 2004. Toutefois, ce secteur représente entre 15 et 20% des émissions totales de la France métropolitaine en fonction de l'année considérée.

Les perspectives à court terme restent orientées à la baisse avec notamment en 2005 la mise en oeuvre de l'arrêté du 20 septembre 2002 (directive européenne 2000/76/CE) relatif à l'incinération des déchets.



## Références bibliographiques

**Abraham C.R., Selkoe D.J., Potter H., Price D.L., Cork L.C.** -  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin is present together with the  $\beta$ -protein in monkey brain amyloid deposits. *Neuroscience* 1989, 32, (3), 715-720.

**Ahmadian M., Duncan R.E., Jaworski K., Sarkadi-Nagy E., Sul H.S.** - Triacyl glycerol metabolism in adipose tissue, *Future Lipidol.* 2007 (2), 229-237.

**Ahmadian M., Wang Y., Sul H.S.** - Lipolysis in adipocytes, *Biochem. Cell Biol.* 2010, 42, 555-559.

**Alberts J.J., Wahlgren M.A., Orlandini K.A., Durbahn C.A.** - The distributions of  $^{39,240}\text{Pu}$ ,  $^{238}\text{Pu}$ ,  $^{241}\text{Am}$  and  $^{137}\text{Cs}$  among chemically-defined components of sediments, settling particulates and net plankton of Lake Michigan Original Research Article. *J. of Environ. Radioactivity* 1989, 9 (2), 89-103.

**Amaro S., Monda M., de Luca B.** - EEG arousal, sympathetic activity, and brown adipose tissue thermogenesis after conditioned taste aversion. *Physiol. Behav.* 1996, 60 (1) 71-5.

**Angelova M.I., Soléau S., Méléard P., Faucon J.F., Borothel P.** - Preparation of giant vesicles by external AC electric field. Kinetic and applications *Prog. Colloid Polym. Sci.* 1992, 89, 127.

**Angelova M. I., et Dimitrov D.S.** - Liposome electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc* 81, 303-311, 345-349, (1986).

**Arner P.** - The role of adipose tissue in lipoprotein metabolism. *Atherosclerosis, Vol. Supplement* , 1999, 1, 11-12.

**Azenbacher P. et Anzenbacherova** - Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics- Review *CMLS. Cell. Mol. Life Sci.*, 2001, 58, 737-47.

**Abdiche N., Myszka G.** - Probing the mechanism of drug/lipid membrane interaction using Biacore, *Anal. Biochem.* 2004, 328, 233-43.

**Agre P., Bonhiver M.J.** - The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems. *J. Bio Chem.* 1998, 273, 14659-62.

**Ailhaud G., Grimaldi P., Négrel R.** - Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr*, 1992, 12, 207-33.

**Aissa P.** - Ecologie des nématodes libres de la lagune de Bizerte. Dynamique et biocénotique. Thèse de doctorat d'Etat. Faculté des sciences, Tunis, p,370 (1991).

**Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K.** - *Molecular biology of the cell*, 2nd ed.: Garland Publishing Inc.: New York, (1989).

**Armstrong C.M., Hille B.** - Voltage-gated ion channel structure and electrical excitability. *Neuron*, 1998, 20, 371-80.

**ATSDR** - Toxicological Profiles for PCB. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA: U.S department of Health and Human Services, Public Health Services. <http://www.atsdr.cdc.gov/>. (2000).

**ATSDR** - The Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), a public health agency of the U.S. Department of Health and Human Services, announced today the release of the draft results of its public health assessment for the Bellevue Park site in Anchorage, KY. (Jefferson County, Anchorage, Kentucky), (2000).

**Azouz, A.** - Etude des peuplements et des possibilités d'ostréiculture du lac de Bizerte. Ann. Inst. Océano. Pêches. Salammbô. 1966, 15, 1-69.

**Baars P.C., Meijer S., Pijpers R., Hoekstra O.S., Teule G. J. J.** - Value of additional staging following tumour positive sentinel node (SN) biopsy in breast cancer. European J. of Cancer, 2001, 37, (6), 166.

**Baird David T.** - Medical abortion in the first trimester. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology, 2002, 16, (2), 221-36.

**Bard S.M.** - Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. Aquat. Toxicol., 2000, 48 (4) 357-89.

**Bard D.** - Résultats scientifiques et décisions de santé publique : quelques paradoxes. Environnement, Risques et Santé 2010, 9, 303-6.

**Bacetti B., Collodel G., Piomboni P.** - Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae semiologicae 9). J. Submicrosc Cytol. Pathol. 28 (4), 587-96, (1996).

**Bangham A.D., Standish M.M., Watkins J.C.** - Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. J. Mol. Biol. 1965, 13, 238-52.

**Baekmark T., Elender G., Lasic D., Sackmann E.** - Conformational transitions of mixed monolayers of phospholipids and poly(ethylene oxide) lipopolymers and interaction forces with surfaces. Langmuir, 1995, 11, 3975-87.

**Basdevant A.** - Propositions d'actions pour l'amélioration des conditions de prise en charge des personnes obèses dans les établissements de santé, (2009).

**Basnar M., Hery M., Printemps R. et Daszuta** - Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone, Neuropsychopharmacology, 2004, 29, 450-460.

**Beaume P.H. and Loriot M.A.** - Bases moléculaires de la susceptibilité aux xénobiotiques : Aspects métaboliques. Medecin science, 16 (10), 1051-1056, (2000).

**Berg O.G., von Hippel P.H.** - Diffusion controlled macromolecular interactions. Ann rev Biophys, 1985, 14, 131-160.

**Berridge M.J., Bootman M.D., Lipp P** - Calcium-Alife and death signal. *Nature*, 1998, 395, 645-8.

**Blinder W.H., Barragan V., Menger F.M.** - Domains and Rafts in lipid Membranes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2003, 42, 5802-27.

**Bretscher M.** - The molecules of the cell membrane, *Sci. Am.* 1985, 253(4), 100-108.

**Bruinsma R., Behrisch A., Sackmann E.** - Adhesive switching of membrane: experiment and theory. *Phys. Rev. E*, 61, 4253, (2000).

**Byczkowski J.Z. et Kulkami A.P.** - Lipid peroxydation and benzo(a)pyrène derivation cooxygenation by environmental pollutants, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1990, 45, 633-40.

**Bordin G., McCourt J., Cordeiro Raposo F., Rodriguez A.R.** - Metallothionein-like metalloproteins in the Baltic clam *Macoma balhica*: seasonal variations and induction upon metal exposure, *Mar. Biol.* 1997, 129, 453-63.

**Calow P.** - Physiological costs of combating chemical toxicants: ecological implications. *Comp. Biochem. Physiol.* 1991, 100, 3-6.

**Castan-Laurell I., Boucher J., Rey A., Sibrac D., Gesta S., Pagès C., Daviaud D., Simon M.F., Lafontan M., Saulnier-Blachet J.S., Valet P.** - Développement d'une obésité nutritionnelle chez des souris transgéniques ayant une réceptivité adrénérgique du tissu adipeux comparable à celle de l'homme.

Transgenic mice with a human-like adrenergic receptivity in adipose tissue become overweight *Pathol. Biol.* 2002, 50, (1) pages 52-7.

**Catterall W.A.** - Molecular properties of a superfamily of plasma membrane cation channels. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1994, 6, 607-15.

**Choi Y.H., Park S., Hockman S., Zmuda - Trzebiatowska E., Svnnelid F., Haluzik M., Gavrilova O., Ahmad F., Pepin L., Napolitano M., Taira M., Sundler F., Stenson-Holst L., Degerman E., Manganiello V.C.** - Alteration in regulation of energy homeostasis in cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B-null mice, *J. Clin. Invest.* 2006, 11 (6), 3240-51.

**Clapham D.E.** - Calcium signalling. *Cell* 1995, 80, 259-68.

**Chapman Peter M., Farrel Melody A., Brinkhurst Ralph O.** - Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to combinations of pollutants and environmental factors Original Research Article. *Aquatic Toxicology*, 1982, 2 (1), 69-78.

**Chapman C.B. et Mitchell G.F.** - *Fasciola hepatica*: Comparative studies on fascioliasis in rats and mice. *International J. Parasitol.*, 1982, 12 (1), 81-91.

**Christie N. et Costa M.** - In vitro assessment of the toxicity of metals compounds. IV Disposition of metals in cells: interaction with membranes, glutathione, metallothionein and DNA. *Biol. Trace Elem. Res.* 6, 139-158, (1984).

**Cooper E.C., Jan L.Y.** - Ion channel genes and human neurological disease: Recent progress, prospects and challenges. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96, 4759-66.

**Corvis Y., Korchowiec B., Paluch M., et Rogalska E.** - A Langmuir film approach to elucidating interactions in lipid membranes: 1,2- dipalmitoyl-*sn*-glycero-phosphoethanolamine / cholesterol/metal cation systems, Chemistry and Physics of Lipids, 2006, 144, 127-36.

**Cossu-Leguille C. et Vasseur P.** - Activités de systèmes antioxydants chez *Unio tumidus*, bivalve dulçaquicole en conditions physiologiques et de stress chimique. Source : [Notes : 99] (152 ref.).(Travaux universitaires, 1996, 96, METZ 0057).

**Cossu C., Doyotte A., Jacquin M.C., Vasseur P.** - Biomarqueurs du stress oxydant chez les animaux aquatiques. In : Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C., Ramade F. (Eds) : Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Masson, Paris, Milan, Barcelone, 1997, 149-63.

**Couillard Y., Campbell P.G.C., Tessier A., Pellerin-Masicotte J., Auclair J.C.** - Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient, I. Temporal changes in metallothionein and metal (Cd, Cu, and Zn) concentrations in soft tissues, Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1995a, 52, 690-702.

**Cowan J. A., Huang H.W., Hsu L.Y.** - Sequence selective coordination of Mg<sup>2+</sup> (aq) to DNA. Original Research Article. J. of Inorg. Biochem. 1993, 52, (2), 121-129.

**Cullis R.R. et Hope M.J.** - Physical properties and functional roles of lipids in membranes, in Vance D.E. and Vance J. (Eds.), Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes, 1991, Elsevier.

**Curran P.K., Fishman P.H.** - Endogenous beta 3- but not beta 1-adrenergic receptors are resistant to agonist-mediated regulation in human SK-N-MC neurotumor cells, Cell. Signal. 1996, 8, 355-64.

**Dixon R.A.** - Structure and function of G protein-coupled receptors. Annu. Rev. Biochem. 1994, 63, 101-32.

**Duarte-Davidsàn R., et Jones K.C.** - Polychlorinated biphenyls (PCBs) in the UK population : Estimated intake, exposure and body burden. Sci. Total Environ. 1994, 151, 131-52.

**Duncan R.E., Sarkadi-Nagy E., Jaworski K., Ahmadian M., Sul H.S.** - Identification and functional characterization of adipose specific phospholipase A<sub>2</sub> (AdPLA), Biol. Chem. 2008, 283, 25428-36.

**Dutzler R., Campbell E.B., Cadene M. et al.** - X-ray structure of a CLC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. 2002, 415, 287-94.

**Doolittle R.F.** - Microbial genomes opened up. 1998, 392, 339-42.

**Doolittle W.F.** - A paradigm gets shifty. (Origins of eukaryotes). 1998, 392, 15-16.

**Decher, G. et Hong, J.D.** - Macromol. Chem. Macromol. Symp. 1991, 46, 321.

**Decher, G.** - Science 1997, 277, 1232.

**Decher G., Maclellan J., Sohling U., Reibel J.** - Creation and structural comparison of ultrathin film assemblies: transferred freely suspended films and Langmuir-Blodgett films of liquid crystals. Thin Solid Films. 1992, 30 (2) 504-7.

**Dellali M., Roméo M., Aissa P.** - Suivi annuel de l'activité catalase chez des moules et des palourdes originaires de la lagune de Bizerte. Oceanol. Acta. 2001, 24 (3).

**Delpeuch F., Maire B., Monnier E.** : "Tous obèses" (Préface de Marian Apfelbaum) aux Editions Dunod, Quai des sciences-2006, p, 187.

**Di Giulio R.T., Habig C., Gallagher E.P.** - Effects of Black Rock Harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish. Aquat. Toxicol. 1993, 26, 1-22.

**Dreyer L., Andersen A., Pukkala E.** - External environment, APMIS. 1997, 76, 80-82.

**Dugas B.** - Glisodin®, a nutraceutical product that promotes the oral delivery of superoxide dismutase. Free Radic Biol Med 2002, 33, (64).

**Dupas D., Géraut C.** and pour le réseau - Bilan 2002 du RNVPP : les affections dermatologiques. Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement. 2004, 65, (4), 359-60.

**Dawidowicz Eliezar A.** - Lipid Exchange: Transmembrane Movement, Spontaneous Movement, and Protein-Mediated Transfer of Lipids and Cholesterol. Original Research Article. Current Topics in Membranes and Transport, 1987, 29, 175-202.

**Elbert D.L., Herbert P., Cuisinier F.J.G., Decher G. et al.**- Thin polymer layers formed by polyelectrolyte multilayer techniques on biological surfaces. Langmuir, 1999, 15, 5355-62.

**Epel D.** - Use of multidrug transporters as first line defense against toxins in aquatic organisms. Comp. Biochem. Physiol. 1998, 120, 23 - 8.

**Estreicher A., Iggo R.D.** - A simple functional assay for screening cell lines, blood, and tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995, 92, 3963-7. U. Le HAVRE/ Ecotox.

**Eufemia N.A., Epel D.** - Induction of the multixenobiotic defense mechanism (MXR). P-glycoprotein in the mussel *Mytilus californianus* as a general cellular response to environmental stress. Aquat. Toxicol. 2000, 49 (1-2), 89-100.

**Evans, E.** - Bending resistance and chemically induced moments in membrane Biophys. J., 14 1974, p, 923.

**Evans E., Waugh R.** - Mechano-chemistry of closed, vesicular membrane systems J. Colloid and Interface Science. 1977, 60 (2) p, 286.

**Evans E., Waugh, R.** - Osmotic correction to elastic area compressibility measurements on red cell membrane *Biophys. J.*, 1977, 20 p, 307.

**Evans E. et Hochmuth R.M.** - Mechanochemical properties of membranes *Current topics in membranes and transport.* 1978, 10, 1.

**Evans E.** - Adhesion of surfactant- covered droplets: special features and curvature elasticity effects *Colloids and Surfaces*, 1990, 43, 327.

**Fa N.** - Micro-rheology of giant vesicles : Thèse de Doctorat, Laboratoire de dynamique des fluides complexes. Thèse de Doctorat, 2003, p.187.

**Faure E.** - L'obésité, *Journal du caducée pour les professionnels de la santé*, (2010).

**Flaman J-M., Frebourg T., Moreau V., Charbonnier F., Martin C., Chappuis P., Sappino A-P., Limacher J-M., Bron L., Benhattar J., Tada M., Van Meir E.G., Estreicher A. & Iggo R.D.** - A simple functional assay for screening cell lines, blood, and tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 92, 3963-7. U. Le HAVRE/ECOTOX.

**Firestone M.A., Wolf A.C, Seifert S.** - Small-Angle X-ray Scattering Study of the Interaction of Poly(ethylene oxide)-b-Poly(propylene oxide)-b-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymers with Lipids, Bilayers, Biomacromolecules. 2003, 4(6), 1539-49.

**Firestone M.A., Tiede D.M., Thiyagarajan P.P.** - Stimuli- Responsive Polymer-Grafted Lipid- Based Complex Fluids as Organised Media for supramolecular Photochemistry. *Division of Fuel Chemistry Symposia Preprints*, 2002, 45(2), 375-9.

**Firestone M.A., Tiede D.M., Thiyagarajan P.P.** - Evaluation of Supramolecular Architecture in a Membrane-Mimetic Smart Gel by Neutron and X-ray Scattering, in *Proceedings of the Materials Research U160-172 using Cold Neutrons at Pulsed Neutron Sources Conference*, World Scientific Publ. 1999, 160-72.

**Fries G. F., Marrow G. S.** - Influence of soil properties on the uptake of hexachlorobiphenyls by rats. *Chemosphere.* 1992, 24 (1), 109-13.

**Garrigue E., de Glisezinski, Harant I., Moro C., Pillard F., Crampes F., Rivière D.** - Métabolisme lipidique et exercice musculaire chez le sujet obèse. *Sciences et sport*, 2005, 21, 68-73.

**Garrigues P, Raoux C, Lemaire P, Ribera D, Mathieu A, Narbonne JF, Lafaurie M.** 1990. In situ correlations between polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and PAH metabolizing system activities in mussels and fish in the Mediterranean sea: preliminary results. *Intern. J. of Environ. Anal. Chem.* 1990, 38, 379-87.

**Garçon G., Garry S., Gosset P., Zerimech F., Martin A., Hannotiaux M.H., Shirali P.** - Benzo[a]pyrene coated onto Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles induced lung tissue injury : role of free radicals, *Cancer Lett.* 2001, 167, 7-15.

**Garçon G., Gosset P., Garry S., Marez T., Hannotiaux M.H., Shirali P.** - Pulmonary induction of proinflammatory mediators following the rat exposure to benzo[a]pyrene coated onto Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles, *Toxicol. Lett.* 2001, 121, 1076-117.

**Garçon G., Ledoux F., Hanothiaux M. H., Zerimech F., Puskarić E., Shirali P.** - Urban particulate air pollution and evaluation of its toxicity on human pulmonary cells in culture, 6<sup>th</sup> International Aerosol Conference, Taiwan, (2002).

**Ge W.** - Macro-scale phenomena reproduced in microscopic systems-pseudo-particle modeling of fluidization *Chemical Engineering Science*. 2003, 58, (8), 1565-85.

**George S.G., Olsson P.** - Mettalothioneins as indicators of trace metal pollution, in: Kramer K.J.M. (Ed.), *Biomonitoring of Coastal waters and Estuaries*, CRC, Boca Raton, FL. 1994, 151-78.

**Gilman A.G.** - G proteins : Transducers of receptor, generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 1987, 56, 615-49.

**Guéguen Y., Mouzat K., Ferrari L., Tissandie E., Lobaccaro J.M.A., Batt A-M., Paquet F., Voisin P., Aigueperse J., Gourmelon P., Souidi M.** - Les cytochromes P 450 : métabolisme des xénobiotiques, régulation et rôle en clinique. *Anal. de Biol. Clin.* 2006, 64, (6) 535-48.

**Gueye Papa Madièye :** Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra érythrocytaire sur le globule rouge. Thèse de Doctorat Strasbourg. 2007, p, 252.

**Gorbel F., Goujelbene M., Makni-Ayadi F., Guermazi F., Croute F., Soleilhavoup J.P., El Feki A.** - Exploration des effets cytotoxiques du plomb sur la fonction sexuelle endocrine et exocrine chez le rat pubère mâle et femelle. Mise en évidence d'une action apoptotique. *Acad. des Sci./ Ed. Scient. et méd. Elsevier S.A.S., C.R. Biologies.* 2002, 325, 927-40.

**Gottesman M.M. et Pastan I.** - Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* 1993, 62, 385-427.

**Grova N., Feidt C., Crepineau C., Laurent C., Laguerre P.E., Hachimi A. et Rychen G.** Detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Levels in Milk Collected Near Potential Contamination Sources. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 4640-2.

**Grova N., Monteau F., Le Bizec B., Feidt C., Andre F. et Rychen G.**- Determiation of Phenanthrene and Hydroxyphenanthrenes in Various Biological Matrices at Trace Levels using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 2005, 29, 175-81.

**Grochowalski A.** - Sample Pretreatment Methods for the Determiation of Mycotoxins and other Hazardous Substances (dioxins) in Food and Feeding Materials using Gas Chromatography and Double Fragmentation Mass Spectrometry -MS/MS. Laboratory for Trace Organic Analysis, Department of Chemical Engineering and Technology, Cracow University of Technology, Warszawska 24, 31-155 Kraków.

**Grunewald S., Paasch U., Glander H.J.** - Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting. *Cell Tissue Bank.* 2004, 2 (3), 187-210.

**Hay D.N.T., Rickert P.G., Seifert. S., Firestone M.A.** - Thermoresponsive nanostructures by self-assembly of a poly(N-isopropylacrylamide)\_lipid conjugate. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 2290-1.

**Heimburg T.A.** - Model for the lipid pretransition : coupling of ripple formation with the chain-melting transition. *Biophys. J.* 2000, 78, 1154-65.

**Helfrich, W.** Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments. *Z. Naturforsch. [C]* 1973, 28, 693-703.

**Helfrich, W.** - Lipid Bilayer spheres : deformation and birefringence in magnetic fields. *Physics. Lett. A.* 1973, 43, 409-10.

**Helfrich, W.** -The size of sonicated vesicles. *Physics. Lett. A.* 1974, 50, 115-6.

**Hills B.A.** Boundary lubrication in vivo. *Proc Inst Mech Eng H-J Eng Med*, 2000, 214, (1), 83-94.

**Hisette-Jourdain M.L.** - Etalement de vésicules bioadhésives sur les tapis d'ADN. Thèse de Doctorat. Université Louis Pasteur. 2007, p, 136.

**Hu H., Tobinowitz M., Smith D.** - Bone lead as biological marker in epidemiological studies of chronic toxicity: conceptual paradigms, *Environ. Health Persp.* 1998, 106, 1-8.

**Hu H.** - Bone lead as a new biologic marker of lead dose: recent finding and implications for public health, *Environ Health Persp.* 1998, 106, 961-7.

**Hutcheon D.E., Kantrowitz J., Van Gelder R.N., Flynn E.** - Factors affecting plasma benzo(a)pyrene levels in environmental studies. *Environ. Res.* 1983, 32, 104-10.

**Hochmuth R.M.** - Micropipette aspiration of living cells, *J. Biomechanics.* 2000, 33 p, 15.

**Houslay M. D.** - Dynamics of biological membranes; Wiley: New York, (1982).

**IARC-** Overall evaluations of carcinogenicity: An updating of volumes 1 to 42. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Lyon, World Health Organization. 1987, 321-2.

**INRS** - Les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Prévention des facteurs de risque. Rapport annuel. Arrêté du 7 août 1997 relatif aux limitations de mise sur le marché et d'emploi de certains produits contenant des substances dangereuses.

**Insel P.A.** - Adrenergic receptors-Evolving concepts and clinical implications. *N Engl. J. Med.* 1996, 334, 580-5.

**INSERM** - Expertise collective "Cancers-environnement". Paris : Inserm éditions, 2008.

**Illinois Department of Public Health Division of Environmental Health** 525 W. Jefferson St. Springfield, IL 62761.

**Irigaray P., Ogier V., Jacquenet S., Notet V., Sibille P., Mejean L., Bihain B.E., Yen F.T.** Benzo(a)pyrene impairs beta-adrenergic stimulation of adipose tissue lipolysis and causes weight gain in mice : a novel molecular mechanism of toxicity for a common food pollutant. *FEBS J.* 2006, 273, 1362-72.

**Irigaray P., Newby J.A., Lacomme S., Belpomme D.** - Overweight/obesity and cancer genesis: More than a biological link, *Biomed. Pharmacother.* 2007, 61: 665-78.

**Irigaray P., Lacomme S., Mejean L., Belpomme D.** - *Ex vivo* study of incorporation into adipocytes and lipolysis-inhibition effect of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Toxicol. Lett.* 2009, 187, 35-39.

**Israelachvili J. N.**- Intermolecular and surface forces; 2nd ed.; Academic Press, 1992.

**Jalbert M., Maître A., Stoklov M., Romazini, Morin B., Perdrix A.** - Risque saturnien des opérations de micro-soudure en électronique, *Arch. Mal. Prof.* 1994, 55, 589-94.

**Jaworsky K., Ahmadian M., Duncan R.E., Sarkadi-Nagy E., Varady K.A., Hellerstein M.K., Lee H.Y., Samuel V.T., Shulman G.I., Kim K.H., de Val S., Kang C., Sul H.S.** - AdPLA ablation increases lipolysis and prevents obesity induced by high-fat feeding of leptin deficiency. *Nat. Med.* 2009, 15, 159-68.

**Jenkins C.M., Mancuso D.J., Yan W., Sims H.F., Gibson B., Gross R.W.** - Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities, *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 48968-75.

**Jimenez M., Aranda F.J., Ortiz A.** - The chemical toxic benzo[a]pyrene perturbs the physical organization of phosphatidylcholine membranes. *Environ Toxicol Chem.* 20002, 21,787-93.

**Joseph S.S., Lynham J.A., Colledge W.H., Kaumann A.J.** - Binding of (-)-[3H]-CGP12177 at two sites in recombinant human  $\beta_1$ -adrenoreceptors and interaction with  $\beta$ -blockers, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2004, 369, 525-32.

**Jones K.C., de Voogt P.** – Persistent organic pollutants : state of science. *Environ. Poll.* 1999, 100, 209-221.

**Jones K.C., Strasford J.A., Tidridge P., Waterhouse K.S., Johnston A.E.** - Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in several work environments. *Ann. Occ. Hyg.* 1989, 32, 35-43.

**Juhasz A.L., Naidu R.** - Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons : a review of the microbial degradation of ben[a]pyrene. *International Biodeterioration&biodegradation.* 2000, 45, 57-88.

**Kaback H.R.** - In and out with lac perméase. *Int Rev Cytol.* 1992, 137(A), 97-125.

**Kaback H.R., Wu J.** - From membrane to molecule to the third amino acid from the left with a membrane transport protein. *Q Rev Biophys.* 1997, 30, 333-64.

**Kakizawa Y., Kataoka K.** - Block copolymer self-assembly into monodisperse nanoparticles with hybrid core of antisense DNA and calcium phosphate. *Langmuir*. 2002, 18, 4539-43.

**Kramer R.** - Functional properties of solute transport systems: Concepts and perspectives. *Biochim Biophys Acta*. 1994, 1185, 1-34.

**Kitzinger C., Steiner RF.**- A calorimetric determination of the heat of an antigenantibody reaction. *J. Biol Chem*. 1956, 222 (1), 271-84.

**Kuhl T., Leckband D., Lasic D., Israelachvili J.** - Modulation of interaction force between bilayers exposing short-chained Ethylene-Oxide headgroups. *Biophys. J.* 1994, 66, 1479-88.

**Kuman S., Hedges S.B.** - A molecular timescale for vertebrate evolution. *Science*. 1998, 392, 917-20.

**Kurelec B., Pivcenic B.** - Distinct glutathione-dependant enzyme activities and a verapamil-sensitive binding of xenobiotics in a fresh-water mussel *Anodonta cygnea*. *Biochem. Biophys. RES. Commun*. 1989, 164 (2) 934-40.

**Kurelec B.** - The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Crit. Rev. Toxicol*. 1992, 22 (1) 23-43.

**Lands A.M., Arnold A., McAuliff J.P., Ludueno F.P., Brown T.G.** - *Nature (Lond.)*. 1967, 214, 597.

**Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. et Ramade F.** - Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement Lavoisier Tech & Doc, Paris, 1998, p, 320.

**Lafontan M., Berlan M.** - Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function, (1993).

**Lafontan M., Berlan M.** - Fat cell alpha 2-adrenoreceptors: the regulation of fat cell function and lipolysis. *Endocr Rev*. 1995, 16 (6), 716-38.

**Lafontan M., Berlan M.** - Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? *Trends Pharmacol Sci*. 2003, 24 (6), 276-83.

**Lafontan M., Dang-Tam L., Berlan M.** - Alpha-adrenergic antilipolytic effect of adrenaline in human fat cells of the thigh: comparison with adrenaline responsiveness of different fat deposits. *Eur. J. Clin. Invest*. 1979, 9 (4), 261-6.

**Lafontan M. et Langin D.** - Régulation neurohumorale de la lipolyse : aspects physiologiques et physiopathologiques. *Med. Sci. Paris* 1998, 14 (8-9), 865-76.

**Langin D.** - Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome, *Pharmacol. Res*. 2006, 53, 482-91.

**Langin D., Holm C., Lafontan M.** - Adipocyte hormone-sensitive lipase: a major regulator of lipid metabolism. *Proc. Nutr. Soc*. 1996, 55, 93-109.

- Langin D., Lucas S., Lafontan M.** - Millenium fat cell lipolysis reveals unsuspected novel tracks. *Horm Metab Res.* 2000, 32, 443-52.
- Laher J.M., Rigler M.W., Vetter R.D., Barrowman J.A., Patton J.S.** - Similar bioavailability and lymphatic transport of benzo(a)pyrene when administrated to rats in different amounts of dietary fat, *J. Lipid Res.* 1984,25, 1337-42.
- Lalor G., Rattray R., Vutchkov M., Campbell B., Lewis-Bell** - Blood lead levels in Jamaican school children, *Sci. Total Envir.* 2001, 269, 171-81.
- Laurent C., Feidt C., Laurent F.** - Etat de l'art sur les transferts de polluants organiques et métalliques du sol vers l'animal. Ademe, 2005, p, 240.
- Laurent C., Feidt C., Grova N., Mpassi D., Lichtfouse E., Laurent F., Rychen G.** - Portal absorption of <sup>14</sup>C after ingestion of spiked milk with <sup>14</sup>C-phenanthrene, <sup>14</sup>C-benzo[a]pyrene or <sup>14</sup>C-TCDD in growing pigs. *Chem.* 2002, 48 (8), 843-8.
- Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C.** - Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions, in : Lagadic L., Caquet T., Amiard J.-C., Ramade F. (Eds), *Biomarqueurs en écotoxicité. Aspects fondamentaux*, Masson, Paris, 1997 p, 1-9.
- Leboulenger F., Minier C** - Expression and activity of a multixenobiotic resistance system in the pacific oyster *Crassostrea gigas*, *Mar. Environ. Res.* 2002, 54, 455-9.
- Lee C.H., Petrov P., Döbereiner H.G.** - Curvature of zwitterionic membranes in transverse pH gradients. *Langmuir*, 1999, 15, 8543-6.
- Lee-Chiong T.L., Matthay R.A.** - Lung cancer, in: Harber P., Schenker M.B., Balmes J.R. (Eds), *Occupational and environmental respiratory disease*, St Louis: Mosby, 1995, 259-75.
- Levin M.C., Marullo S., Muntaner O., Andersson B., Magnusson Y.** - The myocardium-protective Gly-49 Variant of the  $\beta_1$ -adrenergic receptor exhibits constitutive activity and increased desensitization and down regulation, *J. Biol. Chem.* 2002, 34, 30429-5.
- Lipowski R., Sackmann E.:** In handbook of Biological Physics, Ed Elsevier, Amsterdam, 1995, 1.
- Liitti S., Närva H., Marjamäki A., Hellman J., Kallio J., Jalkanen M., Matikainen M.T.** - Subtype specific recognition of human  $\alpha_2C2$  adrenergic receptor using monoclonal antibodies against the third intra cellular loop. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1997, 233, 166-72.
- Liitti S., Matikainen M-T., Scheinin M., Glumoff T., Goldman A.** - Immunoaffinity Purification and Reconstitution of Human  $\alpha_2$ -Adrenergic Receptor Subtype C2 into Phospholipid Vesicles. 2001, 22 (1), 1-10.
- Lockitch G.** - Perspectives on lead toxicity, *Clin. Biochem.* 1993, 25, 371-81.

**Livingstone D.R.** - Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 1993, 57, 195-211.U. Bordeaux II. LPTC.

**Lucier G, Clark G, Hiremath C, Tritscher A, Sewall C, Huff J.** - Carcinogenicity of TCDD in laboratory animals: implications for risk assessment. *Toxicol Ind Health*, 1993; 9 (4), 631-68.

**Lutz S., Feidt C., Monteau F., Rychen G., Le Bizec B., Jurjanz S.** – Transfer assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and their principal metabolites to milk after chronic exposure to contaminated soil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2006, 54, 263-268.

**Maire Bernard** - 2006, IRD

**Maillet M.** - Biologie cellulaire, 9ème édition, 2002, Chapitre 2 ; 33-103.

**Marchetti C., Obert G., Deffosez A., Formstecher P., Marchetti P.** - Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum Reprod.* 2002, 17 (5), 1257-65.

**McCarthy J.F., Shugart L.R.** - Biomarkers of environmental contamination. Lewis Publishers, Inc., Boca Raton, F.L., (1990).

**McLachlan M.S.** - A simple model to predict accumulation of PCDD/Fs in an agricultural food chain. *Chemosphere*, 1997, 34, 1263-1276.

**McLachlan M.S., Sewart A.P., Bacon J.R., Jones K.C.** (1996) - Persistence of PDD/Fs in a sludge amended soil. *Environ Sci Technol*, 1996, 30, 8, 2567-71.

**Mc Connell H.M., Keller D.J.** - Cristaux bidimensionnels finis de phospholipides. The American Physical Society. *Phys. Rev. Lett.* 1996, 56, 252-5.

**McLean M.R., Robertson L.W., Gupta R.C.** - Detection of PCB adducts by the 32P-postlabeling technique. *Chem Res Toxicol.* 1996, 9 (1), 165-71.

**Menvielle-Bourg F.J.** - La superoxyde dismutase, puissant antioxydant naturel désormais disponible par voie orale. Consulting and licensing, Paris, France. *Phytothérapie* 2005, N° 3.

**Meille-Jordan A.** - L'obésité, *Journal du caducée pour les professionnels de la santé*, (2002).

**Mertins O., da Silveira N. P., Schröder A.P., et Marques C.M.** - Electroformation of Giant Vesicles from an Inverse Phase Precursor. *Biophysical Journal*. 2008, 96, 2719-26.

**Michel M.**- Fonctionnalisation de films multicouches de polyélectrolytes avec des liposomes enfouis : création de réacteurs immobilisés. Thèse de Doctorat de l'Université Louis Pasteur, Strasbourg I. Discipline : Chimie Physique, 2005, p, 147.

**Minier C., Akcha F., Galgani F.** - P-glycoprotein expression in *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* in polluted seawater. *Comp. Biochem. Physiol.* 1993, 106 (B), 1029-36.U. Le Havre/Ecotox.

**Minier C., Lelong C., Djemel N., Rodet F., Tutundjian R., Favrel P., Mathieu M., Le Boulenger F** - Expression and activity of a multixenobiotic resistance system in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Environ. Res.* 2002, 54, 455-9.

**Mitrakos P., Macdonald P. M.** - DNA-induced lateral segregation of cationic amphiphiles in lipid bilayer membranes as detected via 2H NMR. *Biochemistry* 1996, 35, 16714-22.

**Mitrakos P., Macdonald P. M.** Domains in cationic lipid plus polyelectrolyte bilayer membranes: detection and characterization via 2H nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* 1997, 36, 13646-56.

**Naismith Sprand S.R.** - Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem.* 1998, 23, 74-9.

**Narbonne J.F., Garrigues P., Ribera D., Raoux C., Mathieu A., Lemaire P., Salaün J.P., Lafaurie M.** - Mixed function oxygenase enzymes as tools for pollution monitoring : field studies on the french coast of the Mediterranean sea. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 1991, 100, 37-42. U. Bordeaux II. LPTC.

**Narbonne J. F., Aarab N., Clerandeu C., Daubeze M., Narbonne J., Champeau O. et Garrigues P.** - Scale of classification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in Mediterranean coasts and temporal trends. *Biomarkers.* 2005, 10 (1), 58-71.

**Nebert D.W., Roe A.L., Dieter M.Z., Solis W.A., Yang Y., Dalton T.P.** - Role of the aromatic hydrocarbon receptor and (Ah) gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 2000, 59, 336-42.

**Needham D., Hochmuth R.M.** - Rapid flow of passive neutrophils into a 4 µm pipet and measurement of cytoplasmic viscosity *J.of Biomechanical Engineering*, 1990, 112, p, 269.

**Needham D., Dewhirst M.W.** - The development and testing of a new temperature-sensitive drug-delivery system for the treatment of solid tumors *Adv. Drug Delivery Rev.*, 53, 285, (2001).

**Neff J.A.** - Alcohol consumption and psychological distress among U.S. Anglos, Hispanics and Blacks, *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 21 (1), 111-9, 1986.

**Neff J.A., Husaini BA** - Stress-buffer properties of alcohol consumption: the role of urbanicity and religious identification, *Journal of Health and Social Behavior*, 1985, 26 (3), 207-22.

**Neff J.A.** - Race and vulnerability to stress: an examination of differential vulnerability, *Journal of Personality and Soc. Psychol*, 1985, 49 (2), 481-91.

**Neff J.A.** - Evaluating the stress-buffering role of alcohol consumption: variation by type of event and type of symptom, *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 1985, 20 (4), 391-401.

**Neff J.A.** - Race differences in psychological distress: the effects of SES, urbanicity, and measurement strategy, *American Journal of Community Psychology*, 1984, 12 (3), 337-51.

**Neff J.A.** - The stress-buffering role of alcohol consumption: the importance of symptom dimension, *Journal of Human Stress*, 1984, 10 (1), 35-42.

**Olling M., Derks H.J.G.M., Berende P.L.M., Liem A.K.D., Jong A.P.J.M.** - Toxicokinetics of eight <sup>13</sup>C-labelled polychlorinated dibenzo-p-dioxins and -furans in lactating cows. *Chemosphere*, 1991, 23, 1377-85.

**O'Brien T.J., Beard J.B., Underwood L.J., Dennis R.A., Santin A.D., York L.** - The CA 125 gene : an extracellular superstructure dominated by repeat sequences. *Tumor Biol.* 2001, 22, 348- 66.

**O'Brien T.J., Beard J.B., Underwood L.J., Shigemana K.** The CA 125 gene - a newly discovered extension of the glycosylated N-terminal domain doubles the size of this extracellular superstructure . *Tumor Biol.* 2002, 23, 154-69.

**Oakley G.G., Devanaboyina U., Robertson L.W. , Gupta R.C.** - Oxidative DNA damage induced by activation of polychlorinated biphenyls (PCB): implications for PCB-induced oxidative stress in breast cancer. *Chem Res Toxicol*, 1996a, 9, 8, 1285-92.

**Oakley G.G., Robertson L.W. et Gupta R.C.** - Analysis of polychlorinated biphenyl-DNA adducts by 32P-postlabeling. *Carcinogenesis*, 1996b, 17, (1), 109-14.

**Panova Z., Ivanova S.** -Menstrual function of women, working with organic lead in the production of telephone equipment, *Hig. Zdraveop* 1975, 18, 496-99.

**Pain S., Parant M.** – Le mécanisme de défense multixénobiotique (MDMX) chez les bivalves. *Pharmacol., toxicol. C. R. Biol.* 2003, 326, 659-72.

**Parant M., Pain S.** - Potential use of multixenobiotic defense mechanism (MXDM) in *Dreissena polymorpha* as a biomarker for the monitoring of freshwater pollution. *Water Res.* 2001, 35 (15), 3743-48.

**Payne J.F., Mathieu A., Melvin W., Fancey L.L.**- Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Fields trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Mar. Poll. Bull.* 1996, 32, 225-31. IFREMER DEL/PC.

**Pellerin-Massicote, J.** - Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves. *J. Aquat. Ecosyst. Health.* 1994, 3, 101-111.U. Bordeaux II. LPTC.

**Pelletier C., Despres J.P., Tremblay A.** - Plasma organochlorine concentrations in endurance athletes and obese individuals, *Med. Sci. Sports Exerc.* 2002, 34, 1971-75.

**Pelletier C., Doucet E., Imbeault P., Tremblay A.** - Association between weight loss-induced changes in plasma organochlorine concentrations, serum T(3) concentration and resting metabolic rate, *Toxicol. Sci.* 2002, 67, 46-51.

**Phillips D.L., Smith A.B., Burse V.W., Steele G.K., Needham L.L. et Hannon W.H.** - Half-life of polychlorinated biphenyls in occupationally exposed workers. *Arch Environ Health.* 1989, 44 (6), 351-4.

**Picart C.**, Bulletin SFP, 2006, 155, 11-4.

**Pitcher J.A., Freedman N.J., Lefkowitz** - G protein-coupled receptor kinases. [Review] [255 refs]. Annu. Rev. Biochem. 2004, 653-92.

**Pollard T.D., Earnshaw W.C.** - Biologie cellulaire, édition française, Chapitre 1, 299-397, (2004).

**Post S.R., Aguila-Buhain O., Insel P.A.** - A key role for protein kinase A in homologous desensitization of the beta 2-adrenergic receptor pathway in S49 lymphoma cells. J. Biol. Chem. (1993) 271, 895-900.

**Projet MONERIKA** : IFREMER DEL/PC; Université du Havre ; Université de Bordeaux II/LPTC- Monitoring des effets Biologiques liés au naufrage de l'ERIKA.

**Rand R.P.** - Mechanical properties of the red cells membrane. 1. Membrane stiffness and intracellular pressure Biophys.J. 1964, 4, p, 115.

**Rand R.P.** - Mechanical properties of the red cells membrane. 2. Viscoelastic breakdown of the membrane Biophys.J. 1964, 4 p, 303.

**Rapport du Ministère de la santé** : Politiques publiques, pollution atmosphérique et santé : poursuivre la réduction des risques, Juin 2000.

**Ratner B.D., Johnson A.B., Lenk T.J.** - Biomaterial surfaces. J. Biomed. Mat. Res.: Appl. Biomat., 1987, 21, 59-90.

**Rodriguez-Azira A., Peinado J., Pueyo C., Lopez-Barea J.** - Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas. Can.J. Fish. Aquat. Sci. 1993, 50, 2568-73.

**Roesijadi G** - Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animal, Aquatic Toxicol. 1992, 2 (2), 81-113.

**Roesijadi G.** - Behaviour of metallothioneins-bound metals in a natural population of an estuarine mollusc, Mar. Environ. Res.1994, 38, 147-68.

**Rychen G., Mpassi D., Jurjanz S., Merles M., Lenoir-Wijnkoop I., Antoine J. M. et Laurent F.** - <sup>15</sup>N as a marker to access portal absorption of nitrogen from milk, yogurt and the growing pig. Dairy Res. 2002, 69, 95-101.

**Rychen G., Ducoulombier-Crépineau C., Grova N., Jurjanz S., Feidt C.** - Modalités et risques de transfert des polluants organiques persistants vers le lait. INRA Prod. Anim. 2005, 18, 355-66.

**Richter R., Mukhopadhyay A., Brisson A.** - Pathways of lipid vesicle deposition on solid surfaces: a combined QCM and AFM study. Biophys. J. 2003, 85, 3035-47.

**Rosler A., Vandermeulen G.W.M., Klok H.A.** - Advanced drug delivery devices via self-assembly of amphiphilic block copolymers. Adv Drug Deliv Rev 2001, 53, 95-108.

**Rodbell M., Gilman G.A.** - Prix Nobel de médecine pour leur découverte de la protéine G en 1994.

**Sackmann E.** - The Seventh Datta Lecture. Membrane bending energy concept of vesicle- and cell-shapes and shape-transitions. FEBS Lett. 1994, 346, 3-16.

**Said T.M., Paasch U., Glander H.J., Argawal A.** - Role of caspases in male infertility. Hum Reprod Update. 2004, 10 (1), 39-51.

**Schechter E.** - Biochimie et biophysique des membranes ; 2<sup>nd</sup> ed. ; Masson, (1993).

**Schwinte P., Ball V., Szalontai B., Haikel Y., Voegel J.-C. et al.**- Secondary Structure of Proteins Adsorbed onto or Embedded in Polyelectrolyte Multilayers. Biomacromolecules 2002, 3, 1135-43.

**Sengenés C., Berlan M., De Glisezinski I. et al.** - Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. FASEB J. 2000, 14, 1345-51.

**Silbergeld E. K.** - Neurochemical Approaches to Developing Biochemical Markers of Neurotoxicity: Review of Current Status and Evaluation of Future Prospects Environmental Research, 1993, 63, (2), 274-86.

**Silmani L.** - Les ravages de la malbouffe : Jeune Afrique, Magreb, (2010).

**Singer S.J.** - In "Structure and Function of Biological Membranes" (L.I. Rothman, Ed.), p.145. Academic Press New York, (1971).

**Singer S. J., Nicholson G. L.** The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 1972, 175, 720-31.

**Singer S.J.** - Annu. Rev. Biochem. 1974, 43, 805.

**Singer S.J.** - The proteins of membranes, Journal of Colloid and Interface Science. 1977, 58, N°3.

**Susulic V.S., Frefrich R.C., Lawitts J., Tozzo E., Kahn B.P., Harper M.E., Himms-Hagen J., Flier J.S., Lowell B.B.** - targeted disruption of the beta-3-adrenergic receptor gene. J. Biol. Chem. 1995, 270, 29483-92.

**Steenland K., Loomis D., Shy C. et Simonsen N.** - Occupational causes of lung cancer, in: Harber P., Schenker M.B., Balmes J.R. (Eds), Occupational and environmental respiratory disease, St Louis: Mosby, 1995, 589-607.

**Stein O., Halperin G., Stein Y.** - Interaction between macrophages and aortic smooth muscle cells. Enhancement of cholesterol esterification in smooth muscle cells by media of macrophages incubated with acetylated LDL. Bioch. And Biophys. Acta (BBA)-Lipids and lipids metabolism. 1981, 665, (3), 447- 90.

**Stein O., Dabach Y., Hollande G. et Stein Y.** - Removal of cholesteryl ester from hepatic reticuloendothelial cells in vivo is not enhanced by plasma cholesteryl ester transfer protein. Bioch. And Biophys. Acta (BBA) - Lipids and lipids metabolism. 1981, (2), 238-40.

**Steinberg SF, Alcott S, Pak E, et al.** beta(1)-Receptors increase cAMP and induce ... Cardiovasc Res 1999, 44, 37- 46. 57. Merot J, Probst V, Debailleul M.

**Steinert S.A., Streib-Montee R., Leather J.M., Chadwick D.B.** - DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. Mutat. Res. 1998, 399 (1), 65-85, IFREMER DEL/PC.

**Stick V., De Glisezinskii I., Suljkovicova H. et al.**- Activation of antilipolytic  $\alpha$ 2-adrenergic receptors by epinephrine during exercise in human adipose tissue. Am J Physiol, 1999, 277, 1076- 83.

**Stock A.M., Robinson V.L., Goudreau P.N.** - Two component signal transduction. Annu Rev Biochem. 2000, 69, 183-215.

**Tanford C., Reynolds -**,Caractérisation of membrane proteins in détergent solutions. Biochim. Biophys. Acta. 1976, 457, 133-70.

**Teinberg S.F.** - The molecular basis for distinct  $\beta$ -adrenergic receptor subtypes actions in cardiomyocytes. Cire Res. 1999, 85, 1101-11.

**Telisman S., Cvitkovic P., Jurasovic J., Pizent A., Gavlla M., Rocic B.** - Semen quality and reproductive function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc and copper in men, Environ. Health Persp. 2000, 108, 45-53.

**Topp M.D.C., Dijkstra P.J., Talsma H., Feijen J.** - Thermosensitive micelle-forming block copolymers of poly(ethylene glycol) and poly(n-isopropylacrylamide). Macromolecules. 1997, 30, 8518-20.

**Tremblay A., Pelletier C., Doucet E., Imbeault P.**-Thermogenesis and weight loss in obese individuals: a primary association with organochlorine pollution, Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. 2004, 28, 936-9.

**US-EPA-Framework for Application of the Toxicity Equivalence Methodology for Polychlorinated Dioxins, Furans and Biphenyls in Ecological Risk Assessment.** U.S. Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum. EPA 100/R-08/004. Washington (DC) : US-EPA, 2008. <http://www.epa.gov/raf/tefframework/pdfs/tefs-draft-052808.pdf>

**Vainio H., Wilbourn J.D, Sasco A.J., Partensky C., Gaudin N., Heseltine E., Eragne I.**- Identification des facteurs cancérigènes pour l'homme dans les monographies du CIRC, Bull. Cancer. 1995, 82, 339-48.

**Van der Berg M.J., Birnbaum L.S., Bosveld B.T.C., Brunström B., Cook P.**- Toxic Equivalent Factors (TEF) for PCBs, PCDDs, PCDFs for Humans and Wildlife. Environ. Health Perspectives, 1998, 106, 775-92.

**Varanasi U., Gmur D.J.** - Hydrocarbons and metabolites in english sole (*Parophrys vetulus*) exposed simultaneously to [<sup>3</sup>H]benzo(a)pyrene and [<sup>14</sup>C]naphthalene in oil-contaminated sediment. Aquat. Toxicol. 1989, 1, 49-67.

**Viarengo A., Nott J.A.** - Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates, Comp. Biochem. Physiol. 1993, 104, 355-72.

**Vidy A., Bard D.** Influence de la valeur des Facteurs d'Equivalence de Toxicité (TEF) sur les estimations d'exposition de la population générale et impact décisionnel. Environnement. Risques & Santé 2003 ; 2,159-67.

**Villena J.A., Roy S., Sarkadi-Nagy E., Kim K.H., Sul H.S.** - Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis, J. Biol. Chem. 2004, 279, 47066-75.

**Voet D., Voet G. J.** - Biochimie, les membranes biologiques, Chapitre 11 Section 11-3, 1999, 290-305.

**Walde P.** - Enzymatic reactions in liposomes. Curr. Opin. Colloid Interface Sci.1996, 1, 638-44.

**Walde P., Marzetta B.** - Bilayer permeability-based substrate selectivity of an enzyme in liposomes. Biotechnol. Bioeng. 1998, 57, 216-19.

**Walde P., Ischikawa S.** - Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. Biomol. Eng. 2001, 18, 143-77.

**Whitehead J.P., Clark S.F., Urso B., James D.E.** - Signalling through the insulin receptor. Curr Opin Cell Biol. 2000, 12: 222-8.

**WHO** - Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives Meeting (65<sup>th</sup>: 2005: Geneva, Switzerland). Evaluation of certain food additives: sixty-fifth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, (2006).

**OMS (WHO)** - Organisation Mondiale de la Santé.

**Waugh R., Evans E.** (1979) : Thermoelasticity of red blood cell membrane J. Biophys. 1979, 26, p, 115.

**Wikipedia** - La liberation d'acides gras, 2005.

**Winship K.A.** - Toxicity of lead : a review, Adv. Drug. React. 1989, 8, 117-52.

**Wiseman , Williston S., Brandts J.F., Lin L.** - Rapid Measurement of Binding Using a New Titration Calorimeter, Anal. Biochem. 1989, 179, 131-7.

**Wolff M.S.** - Occupational exposure to polychlorinated biphenyls (PCB). Environ Health Perspect, 1985, 60, 133-8.

**Zagury E., Nomas I., Le Moullec Y., Festy B.** - Enquête auprès des chauffeurs de taxi artisans parisiens : perception de la pollution d'origine automobile, Poll. Atm. J. 1998, 61-70.

**Zimmermann R., Strauss J.G., Haemmerle G., Schoiswohl G., Birner-Gruenberger R., Riederer M., Lass A., Neuberger G., Eisenhaber F., Hermetter A., Zechner R.** - Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase, Science. 2004, 306,1383-6.

## Publications

### 1. Pollution et obésité ... Où est le risque?

*Balbine Amoussou*, Philippe Irigaray, Houssam Deidi, Luc Méjean

<sup>1</sup> URAFPA-INPL, 2, avenue de la Forêt-de-Haye, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy

<sup>2</sup> Lipodomix MTM, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

**OBESITE (Revue francophone pour l'étude de l'obésité). Ed. Springer Science  
ISSN 1951-5995 Volume 3 Numéro 3. Trimestriel Septembre 2008, p, 128-132**

### 2. Polluants, lipolyse et prise de poids

<sup>1</sup> URAFPA-INPL, 2, avenue de la Forêt-de-Haye, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy

<sup>2</sup> Lipodomix MTM, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Luc Méjean, Philippe Irigaray, *Balbine Amoussou*, Houssam Deidi.

**Edition de santé. Volume 6, N° 4, Août 2008**

### 3. Link between Polycyclic aromatic hydrocarbons and inhibition of lipolysis: receptological investigation on human $\beta$ -adrenergic receptors and study of PAH accumulation in phospholipids vesicles (sous presse)

*Balbine A. Amoussou*<sup>1</sup>, Yann Guiavarch<sup>1</sup>, Luc Méjean<sup>1</sup>, Carlos Marques<sup>2</sup>, André Schröder<sup>2</sup>

<sup>1</sup> URAFPA-INPL, 2, avenue de la Forêt-de-Haye, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy

<sup>2</sup> Institut Charles SADRON CNRS, 23, rue de Loess, 67037 Strasbourg Cedex

**Revue Obesity, date de soumission : Novembre 2010**

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE  
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL  
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur Jacques DELARUE, Professeur, Université de Brest, Brest**

**Monsieur Denis LAIRON, Directeur de Recherche, Faculté de Médecine, Marseille**

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

**Madame AMOUSSOU Akouavi Balbine épouse FAGLA**

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,  
une thèse intitulée :

**"Etudes des interactions polluants aromatiques polycycliques (HAP) - récepteurs  
adrénergiques - phospholipides membranaires dans le tissu adipeux"**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Sciences Agronomiques** »

Fait à Vandoeuvre, le 22 novembre 2010

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT



NANCY BRABOIS  
2, AVENUE DE LA  
FORET-DE-HAYE  
BOITE POSTALE 3  
F - 54501  
VANDŒUVRE CEDEX

## **Etude des interactions polluants aromatiques polycycliques (HAP) - récepteurs adrénergiques - phospholipides membranaires dans le tissu adipeux**

### **Résumé**

L'obésité est une maladie définie par une accumulation de masse grasse dans le tissu adipeux ayant des conséquences néfastes pour la santé. Les causes de l'obésité sont multiples.

Dans un travail récent, il y a été démontré le rôle de la pollution environnementale dans la prise de poids.

Dans ce travail, les hypothèses selon lesquelles les récepteurs adrénergiques situés à la surface des cellules adipeuses seraient le siège de l'action des polluants aromatiques polycycliques ont été vérifiées par le dosage de plusieurs agonistes et antagonistes spécifiques et non spécifiques en présence ou non du benzo[a]pyrène sur des récepteurs humains et de cellules d'hamster chinois (CHO).

Les quantités d'AMPc obtenues montrent que les HAP ne se déposent pas sur les récepteurs  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  adrénergiques.

Cette accumulation se fait au niveau des phospholipides de la membrane cytoplasmique des cellules. Ce qui cause une rigidité des membranes.

Cette observation tend à renforcer l'hypothèse selon laquelle le benzo[a]pyrène induirait une inhibition de la lipolyse par l'accumulation au niveau de la bicouche de phospholipides et des changements de conformation de la bicouche de phospholipides dans les environs des récepteurs à sept domaines transmembranaires qui sont  $\beta$ -adrénergiques.

La liaison de la bicouche phospholipidique avec les HAP utilisés est une réaction exothermique avec un faible dégagement de chaleur.

**MOTS-CLEFS** : benzo[a]pyrène - pyrène - fluoranthène - lipolyse - adrénaline - vésicules géantes de phospholipides (GUVs) - liposomes.

---

## **Interrelationship between PAH – adrenergic receptors – phospholipid membranes in adipose tissue**

### **Abstract**

Obesity is a disease defined by an accumulation of fat in adipose tissue with adverse consequences for health. The causes of obesity are many.

In recent work, there was demonstrated the role of environmental pollution in weight gain.

In this work, the assumptions that the adrenergic receptors on the surface of fat cells would home to the accumulation of polycyclic aromatic pollutants have been verified by measurement of several agonists and antagonists specific and non-specific in the presence or absence of benzo[a]pyrene receptors on human cells and Chinese hamster (CHO). The amounts of cAMP obtained showed that PAHs are not deposited on  $\beta$ -receptors,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  adrenergic receptors.

This accumulation occurs at the cytoplasmic membrane phospholipids of the cells. What causes stiffness of the membranes. This observation tends to reinforce the hypothesis that benzo [a]pyrene induce an inhibition of lipolysis by the accumulation in the phospholipid bilayer and conformational changes of the bilayer phospholipids in the vicinity of receptors seven transmembrane domains which are  $\beta$ -adrenergic receptors.

Binding of phospholipid bilayer with PAHs used is a reaction exothermic with a low heat.

**KEYS WORDS** : benzo[a]pyrene - pyrene - fluoranthene - lipolysis - epinephrine - giants phospholipid vesicles (GUVs) - liposomes.