

# Les 10<sup>es</sup> Entretiens de nutrition, institut Pasteur de Lille L'obésité, une maladie nutritionnelle

## Pollution et obésité... Où est le risque ?\*

B. Amoussou<sup>1</sup>, Y. Guivarch<sup>1</sup>, H. Heidi, F. Yen<sup>2</sup>, L. Méjean<sup>1</sup>

<sup>1</sup> URAFPA-INPL, 2, avenue de la Forêt-de-Haye, F-54500 Vandœuvre-Lès-Nancy, France

<sup>2</sup> Lipidomix MTM, F-54500 Vandœuvre-Lès-Nancy, France

**Résumé :** Les relations entre adipocytes et polluants ne se limiteraient pas à un simple stockage moléculaire, les polluants suivant les mouvements des acides gras au gré des alternances des états de lipolyse et de lipogenèse : l'étude menée in vitro sur des souris confirme que la présence de faibles quantités de benzo(a)pyrène (B[a]P) dans l'alimentation ou dans l'environnement de l'animal induit une prise de poids significative dès les premiers jours de l'exposition. L'étude in vitro sur des adipocytes isolés de souris montre que le phénomène est en lien avec un dysfonctionnement de récepteurs transmembranaires ( $\beta$ -récepteurs, récepteurs MC2-R). De récents résultats mettent en cause l'accumulation des polluants dans la membrane cellulaire, provoquant une modification de l'intégrité de ces récepteurs spécifiques. Le caractère ubiquitaire du phénomène est par ailleurs souligné.

**Mots clés :** Polluants – Adipocytes – Récepteurs transmembranaires

### Pollution and obesity... Where lies the risk?

**Abstract:** The relationship between adipocytes and pollutants does not appear to be limited to molecular storage only, as pollutants follow the movements of fatty acids as they alternate between lipolysis and lipogenesis: an in vitro study in mice confirms that the presence of small quantities of benzoapyrene in the animal's food or environment gives rise to significant weight gain from the very first days of exposure. An in vitro study of isolated mouse adipocytes shows that the phenomenon is linked to a malfunction of transmembrane receptors ( $\beta$  receptors, MC2-R receptors). Recent

results suggest that an accumulation of pollutants in the cell membrane might affect the integrity of these particular receptors. The phenomenon's ubiquitous nature is also emphasised.

**Keywords:** Pollutants – Adipocytes – Transmembrane receptors

### Introduction

Dans un travail réalisé en collaboration [1], Henri Schroeder et Claude P. Muller avaient montré que des rats « intoxiqués » par de fortes doses de benzo(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 aux 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.

### Démarche expérimentale

*Le phénomène est lié à un dysfonctionnement de la fonction lipolytique*

Lorsque des souris sont exposées par voie orale, respiratoire ou intrapéritonéale à de faibles quantités de polluants, elles grossissent : ce résultat nous l'avons obtenu alors que nous étudions le rôle du tissu adipeux dans la mise en

réserve de polluants dioxiniques [2]. Le modèle que nous avons développé est celui de la souris mâle C57bl/6j nourrie ad libitum et intoxiquée par voie intrapéritonéale tous les deux jours avec du B[a]P à la dose de 0,5 mg/kg de poids<sup>1</sup>. La prise de poids au bout de 12 jours est doublée par rapport à la croissance des souris « non pollués ». C'est à partir de ce modèle (souris, B[a]P) que nous allons poursuivre notre réflexion.

La mesure de la conductivité électrique du corps de l'animal au moyen du système TOBEC (EM-Scan/TOBEC SA-3000 modèle [EM-SCAN Inc., Springfield, IL]) permet, moyennant l'utilisation d'un modèle mathématique validé, de mettre en évidence une augmentation progressive et significative du pourcentage de masse grasse chez ces animaux.

Par ailleurs, si la détermination de la lipacidémie plasmatique n'objective pas de différence entre les animaux sous B[a]P et ceux non exposés, il n'en est pas de même lorsque l'on mesure la réactivité à l'adrénaline des deux lots d'animaux : la libération des acides gras et du glycérol, sous l'effet de la lipolyse induite par l'adrénaline, est significativement abaissée chez les animaux ayant reçu de petites quantités de polluants.

Une PCR 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.

### *La lipolyse induite par l'adrénaline est altérée par la présence de polluant dans le milieu de survie de l'adipocyte*

La présence de polluant de type B[a]P semble provoquer, au niveau du tissu adipeux, des perturbations métaboliques. À partir de ce point, nous avons travaillé sur des adipocytes de souris isolés selon la technique de Rodbell et Zalatan et al. [3,4] : séparation des cellules au moyen de collagénase et maintien en vie de celles-ci dans un milieu Krebs-Ringer albuminé. Nous reprenons ci-après les résultats publiés par Irigaray dans le cadre de son travail doctoral [5].

In vitro, la lipogénèse n'est pas altérée. Par contre la lipolyse, objectivée par les libérations de glycérol et d'acides gras, est inhibée significativement : ce phénomène est observé avec des doses de B[a]P de moins de 5  $\mu$ M et des temps d'incubation de moins de cinq minutes.

### *L'effet « polluant » se situe au niveau des récepteurs adrénérgiques*

L'adrénaline est une molécule lipolytique qui agit en se fixant sur les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques de façon non spécifiques. Nous avons vérifié que le phénomène peut être reproduit à l'identique lorsque l'on substitue à l'adrénaline soit de la noradrénaline ou de l'isoprotérénol, agonistes non spécifiques, soit des agonistes  $\beta$  spécifiques :  $\beta_1$ , la dobutamine ;  $\beta_2$ , le salbutamol ;  $\beta_3$ , le BRL 37344.

Le phénomène se situe au niveau du récepteur  $\beta$ -adrénergique présent à la surface de l'adipocyte.

Le phénomène, par contre, n'a pu être reproduit lorsque la lipolyse est induite par la forskoline, molécule pharmacologique qui stimule directement la sous-unité catalytique de l'adénylate-cyclase et la production d'AMP-cyclique (AMPC). Cette voie passe outre la signalisation adrénérgique [6].

De même, l'inhibition lipolytique n'est pas obtenue quand on induit celle-ci par le dibutyryl AMP, dérivé de l'AMPC capable de franchir la membrane plasmique et non hydrolysable par la PDE3B ; le dibutyryl AMP agit par stimulation directe de l'activité de la PKA [7].

Entre les récepteurs et l'adénylate-cyclase, sur le schéma métabolique de la lipolyse, les protéines G jouent un rôle intermédiaire : l'activation de la sous-unité Gs ou l'inhibition de la sous-unité Gi agissent séparément sur la levée d'inhibition de l'adénylate-cyclase. La sous-unité Gs est sous le contrôle de  $\beta$ -récepteurs adrénérgiques alors que la sous-unité Gi est sous celui des  $\alpha$ -récepteurs. La stimulation in vitro des activités respectives des protéines Gi et Gs par les toxines pertusiques et cholériques, en présence et en l'absence de B[a]P, ne montre pas d'effet de ce polluant.

Enfin, la lipolyse induite par activation des récepteurs aux peptides natriurétiques n'a pas été affectée par la présence de polluants.

Par contre, celle induite par l'ACTH (lipolyse qui met en jeu un autre type de récepteur, le MC2-R) est perturbée par la présence de B[a]P.

L'effet du polluant sur la lipolyse induite par l'adrénaline a été reproduit in vitro sur des adipocytes isolés à partir de tissu humain [5].

---

### **Effets d'autres polluants**

Les effets démontrés à partir du B[a]P ne sont pas spécifiques des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) : d'autres polluants présentent le même effet.

Le B[a]P fait partie de la famille des HAP, présents dans la nature chaque fois qu'il existe un phénomène de

<sup>1</sup> Pourquoi deux jours ? Parce que le trouble lipidique objectivé lors d'une administration aiguë persiste durant les deux jours qui suivent l'administration.

combustion : aux abords des usines, et en particulier des usines d'incinération, aux abords des routes et autoroutes, mais aussi dans les barbecues ménagers... Composés hydrophobes et volatils, ils se déposent sur les fourrages, on en retrouve dans le lait, et suivent les lipides dans la chaîne alimentaire. Leur taux d'émission n'a pas diminué dans les dix dernières années.

Le phénomène que nous venons de décrire peut être reproduit quand on substitue au B[a]P certains congénères tels que le chrysène, l'acénaphthène, le fluoranthène, le fluorène et l'anthracène ; par contre, nous n'avons pas pu le mettre en évidence avec trois autres HAP, le naphthalène, le pyrène, le phénanthrène, sans pour autant avoir pu avancer la moindre hypothèse sur l'explication de cette singularité.

D'autres polluants peuvent conduire aussi à une perte de la capacité lipolytique *in vitro* de l'adrénaline : nous avons pu reproduire le phénomène en substituant au B[a]P de la dioxine, l'un des 210 congénères de la famille des PCCD et PCDF, du PCB 126 de la famille des polychlorobiphényles, et plus surprenant car n'appartenant pas à la famille des polluants, l'acétaldéhyde et l'acrylamide.

### Mécanisme d'action

Le mécanisme de cette altération a retenu notre attention... Le phénomène se produit au niveau des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques : il est constaté chaque fois que l'on induit la lipolyse par un agoniste  $\beta$  que celui-ci soit spécifique ou non. Une exception : la lipolyse induite sur l'adipocyte murin par l'ACTH. Or, le récepteur MC2-R de cette hormone a comme point commun avec les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques d'être porteur de sept structures protéiques transmembranaires reliées entre elles par des ponts protéiques soit intra- soit extracellulaires.

*In vitro*, l'inhibition par le B[a]P de la lipolyse semble procéder de l'inhibition directe au niveau de la première étape de signalisation des récepteurs adrénergiques et de l'ACTH qui sont des récepteurs à protéines-G.

L'effet inhibiteur du B[a]P s'est produit en peu de temps (cinq minutes), indiquant qu'il ne procède pas par des changements d'expression de gène ni par des interférences au niveau des procédés de traduction.

### Effets membranaires

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 de 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'intégrité de la membrane affecte son fonctionnement de

la membrane et celui des protéines incorporées en elle [8]. Ce qui n'était pas sans rappeler les difficultés rencontrées avec la tétraline en 1992 [9], qui en raison de son hydrophobicité, se retrouvait préférentiellement dans les membranes lipidiques. L'accumulation excessive de la tétraline cause l'expansion de la membrane et l'affaiblissement des différentes fonctions de la membrane.

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 HAP depuis les lipoprotéines vers les cellules est un transfert spontané [10,11].

L'interaction du B[a]P avec des membranes de phosphatidylcholine a été étudiée en employant diverses techniques physiques. Jimenez et al. [12] observent, en 2002, que lorsque le B[a]P est incorporé à une bicouche de phospholipides, il a pour effet l'expansion et le gonflement de la membrane. Ces deux effets faciliteront la pénétration de l'eau dans la région polaire de la membrane, comme observé par la plus grande hydratation des groupes carbonyles (C = O), et perturbent ainsi l'intégrité et la fonctionnalité de la membrane.

Le B[a]P, du fait de sa position au niveau de la classification faite par l'US-EPA, a donc été longuement étudié. Mais ces études se sont limitées uniquement autour de son pouvoir cancérigène. Peu d'études sont faites en dehors de ce « créneau ». Cependant, une publication relatant un effet au niveau des protéines, avec un effet sur la prise de poids pour une dose faible a été réalisée, en 1985, par Anderson et al. [13].

De même, les doses généralement étudiées sont fortes afin d'observer la pathologie ; les effets sur la prise de poids sont souvent attribués au fait que les tissus cancéreux ont un poids plus important qu'un tissu sain, et ce, à volume égal [14,15].

Citons aussi les résultats de Saunders et al. [16] montrant qu'une seule administration orale de B[a]P, à des doses variant de 25-200 mg/kg à des rats, entraîne une diminution transitoire significative des paramètres d'activité motrice, transitoire car les animaux retrouvent des activités normales 24 heures après l'administration du B[a]P.

Quelques études sont tout de même sorties du contexte cancéreux, avec notamment des travaux portant sur les membranes, montrant une dénaturation de leur structure en présence du B[a]P. Le mécanisme d'incorporation cellulaire du B[a]P est de type diffusion passive [17], avec une tendance à rester incorporé dans la membrane cellulaire [10] perturbant ainsi le fonctionnement de la membrane [8], mais également son organisation [12].

L'inhibition de la lipolyse par le B[a]P résulterait donc très probablement de la perturbation physique de la bicouche phospholipidique de la membrane plasmique. Cette interprétation est fondée sur quatre types d'arguments.

### Travaux in vitro

Le B[a]P altère fortement et rapidement la capacité de signalisation d'au moins quatre récepteurs distincts :  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -,  $\beta_3$ -adrénergique et le récepteur à l'ACTH, dispositif commun dans le sens où tous sont constitués de sept domaines transmembranaires couplés aux protéines elles-mêmes ancrées dans la bicouche de la membrane plasmique.

En revanche, la lipolyse induite par l'ANP, par la stimulation de NPR-A, qui contient un seul domaine transmembranaire n'a pas été affectée par le B[a]P.

### Élasticité extrême de la membrane adipocytaire

L'obésité se caractérise à la fois par une hyperplasie et une hypertrophie des adipocytes, le second caractère signifiant cette élasticité spécifique de la cellule adipeuse.

### Effets de l'acrylamide

Le résultat souligné précédemment selon lequel un phénomène analogue est observé en ajoutant au milieu de lipolyse de l'acrylamide, substance n'ayant pas les mêmes caractéristiques que les toxiques de la série des HAP.

### Travaux récents

Enfin, une investigation récente, menée en collaboration entre l'ENSAIA (Nancy) et le CEREP de Poitiers, a montré que le B[a]P, à des concentrations respectives de  $10^{-5}$  et  $10^{-8}$  M dans le milieu, n'affectait pas du tout le taux de fixation d'un radioligand ( $[^3\text{H}](\text{-})\text{CGP 12177}$ ) sur les récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -adrénergiques humains exprimés respectivement sur cellules HEK-293 et CHO. Ce taux de fixation reste en effet égal à 100 % par rapport au contrôle.

Ce résultat montre clairement que le B[a]P ne se fixe pas sur les récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -adrénergiques humains, contrairement à ce qui avait été envisagé initialement. Cela mériterait d'être confirmé sur récepteurs  $\beta_3$ .

En revanche, à partir d'une concentration de  $10^{-9}$  M dans une suspension de cellules HEK-293 et CHO possédant respectivement les récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ , il a été observé une réduction de l'ordre de 10 % du taux d'AMPc intracellulaire produit via une stimulation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques par de l'isoprotérénol (analogue fonctionnel de l'adrénaline) par rapport au contrôle sans B[a]P. Le fait que ce taux de réduction de production d'AMPc n'augmente pas avec la concentration de B[a]P dans le milieu (jusqu'à  $10^{-4}$  M) pourrait s'expliquer par le fait que la membrane cellulaire ne peut accumuler qu'une quantité « limite » de B[a]P suffisante pour perturber le positionnement des récepteurs et donc la fixation du B[a]P sur ces mêmes récepteurs à hauteur de 10 % environ.

En ce qui concerne l'adipocyte, il est raisonnable de penser que la très forte inhibition de la lipolyse observée,

en présence de B[a]P, est favorisée par une composition en phospholipides membranaires plus favorable à l'accumulation de B[a]P dans la bicouche et donc plus favorable à une perturbation stérique de la stimulation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques.

---

## Conclusion

Les travaux, actuellement publiés sur les relations entre toxiques et obésité [18,19], cherchent à démontrer que l'obésité est un facteur favorisant vis-à-vis de certains risques toxiques : la cellule adipeuse peut servir de lieu de stockage aux toxiques liposolubles : leur libération dans les états de jeûne accentuerait le risque toxique.

Et si l'hypothèse inverse devait être prise en compte : « le risque toxique, facteur de risque d'obésité ». Remarquons que déjà en 1983, Huchon et al. [20] avait émis cette hypothèse !

---

## Références

- Grova N, Valley A, Turner JD, et al. (2007) Modulation of behavior and NMDA-R1 gene mRNA expression in adult female mice after sub-acute administration of benzo(a)pyrene. *Neurotoxicology* 28: 630-6
- Irigaray P, Mejean L, Laurent F (2005) Behavior of dioxin in pig adipocytes. *Food Chem Toxicol* 43: 457-60
- Rodbell M (1964) Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose. *Metabolism and Lipolysis*. *J Biol Chem* 239: 375-80
- Zalatan F, Krause JA, Blask DE (2001) Inhibition of isoproterenol-induced lipolysis in rat inguinal adipocytes in vitro by physiological melatonin via a receptor-mediated mechanism. *Endocrinology* 142: 3783-90
- Irigaray P, Ogier V, Jacquenet S, et al. (2006) 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* 273: 1362-72
- Litosch I, Hudson TH, Mills I, et al. (1982) Forskolin as an activator of cyclic AMP accumulation and lipolysis in rat adipocytes. *Mol Pharmacol* 22: 109-15
- Peterson MJ, Patterson C, Ashmore J (1968) Effects of antilipolytic agents on dibutyryl cyclic AMP-induced lipolysis in adipose tissue. *Life Sci* 7: 551-60
- Sikkema J, de Bont JA, Poolman B (1994) Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J Biol Chem* 18: 8022-8
- Sikkema J, Poolman B, Konings WN, de Bont JA (1992) Effects of the membrane action of tetralin on the functional and structural properties of artificial and bacterial membranes. *J Bacteriol* 174: 2986-92
- Plant AL, Benson DM, Smith LC (1985) Cellular uptake and intracellular localization of benzo[a]pyrene by digital fluorescence imaging microscopy. *J Cell Biol* 100: 1295-308
- Plant AL, Knapp RD, Smith LC (1987) Mechanism and rate of permeation of cells by polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Biol Chem* 25: 2514-9
- Jimenez M, Aranda FJ, Teruel JA, Ortiz A (2002) The chemical toxic benzo[a]pyrene perturbs the physical organization of phosphatidylcholine membranes. *Environ Toxicol Chem* 21: 787-93

13. Anderson PA, Alster JM, Clinton SK, et al. (1985) Plasma amino acids and excretion of protein end products by mice fed 10 or 40 % soybean protein diets with or without dietary benzo[a]pyrene or 1,2-dimethylhydrazine. *J Nutr* 115: 1515-27
14. Sydnor KL, Allen C, Higgins B (1972) Effect of an aqueous extract of cigarette-smoke condensate on benzo[a]pyrene-induced sarcoma and body weight in the rat. *Natl Cancer Inst* 48: 893-909
15. Rigdon RH, Neal J (1966) Effect of feeding benzo[a]pyrene on growth of young mice. *Tex Rep Biol Med* 24: 473-8
16. Saunders CR, Shockley DC, Knuckles ME (2001) Behavioral effects induced by acute exposure to benzo(a)pyrene in F-344 rats. *Neurotox Res* 3: 557-79
17. Brunette DM, Katz M (1975) The interactions of benzo(a)pyrene with cell membranes: uptake into Chinese hamster ovary (CHO) cells and fluorescence studies with isolated membranes. *Chem Biol Interact* 11: 1-14
18. Imbeault P, Chevrier J, Dewailly E, et al. (2001) Increase in plasma pollutant levels in response to weight loss in humans is related to in vitro subcutaneous adipocyte basal lipolysis. *Int J Obes* 25: 1585-91
19. Irigaray P, Newby JA, Lacomme S, Belpomme D (2007) Overweight/obesity and cancer genesis: more than a biological link. *Biomed Pharmacother* 61: 665-78
20. Hutcheon DE, Kantrowitz J, Van Gelder RN, Flynn E (1983) Factors affecting plasma benzo[a]pyrene levels in environmental studies. *Environ Res* 32: 104-10