



HAL
open science

Effet des polluants de type hydrocarbures aromatiques polycycliques sur l'homéostasie lipidique et les récepteurs des lipoprotéines hépatiques

Hamed Layeghkhavidaki

► **To cite this version:**

Hamed Layeghkhavidaki. Effet des polluants de type hydrocarbures aromatiques polycycliques sur l'homéostasie lipidique et les récepteurs des lipoprotéines hépatiques. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2014. Français. NNT : 2014LORR0120 . tel-01751184

HAL Id: tel-01751184

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751184>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



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

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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ DE LORRAINE

École Doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits, Environnement

THÈSE

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

Discipline « Procédés Biotechnologiques et Alimentaires »

par

Hamed LAYEGHKHAVIDAKI

**Effet des polluants de type hydrocarbures aromatiques polycycliques
sur l'homéostasie lipidique et les récepteurs des lipoprotéines hépatiques**

Soutenue publiquement le 7 octobre 2014

Membres du jury :

Rapporteurs :

M. Mustapha CHERKAOUI-MALKI, Professeur, Université de Bourgogne.

M. Jean-Marc LACORTE, Professeur, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI.

Examineurs :

Mme Marie-Christine CHAGNON, Professeur, Université de Bourgogne.

M. Michel LINDER, Professeur, Université de Lorraine.

Mme Frances T. YEN POTIN, Directrice de Recherches INSERM, Université de Lorraine (Co-directrice de thèse)

Mme Catherine CORBIER, Professeur, Université de Lorraine (Directrice de thèse)

Unité de Recherche Animal et Fonctionnalité des Produits Animaux, USC INRA 340

Equipe Biodisponibilité et Fonctionnalités des Lipides Alimentaires

ENSAIA - Université de Lorraine

Sommaire

Remerciements.....	7
Liste des abréviations.....	9
Liste des figures	14
Liste des tableaux.....	16
<i>AVANT-PROPOS</i>	17
<i>INTRODUCTION</i>	20
I. Dérégulation du métabolisme lipidique.....	21
1. Obésité, définition et conséquences en termes de santé publique	21
1.1. L'hyperplasie.....	22
1.2. L'hypertrophie	23
1.3. Les causes de l'obésité.....	25
1.3.1. Les causes génétiques.....	25
1.3.2. Causes environnementales.....	26
1.4. Les substances obésogènes	27
1.4.1. Les obésogènes pharmaceutiques.....	28
1.4.2. Obésogènes d'origine alimentaire	29
1.4.2.1. Le fructose.....	29
1.4.2.2. Le glutamate monosodique	29
2. Les polluants environnementaux et leurs effets obésogènes.....	29
2.1. Les phtalates	30
2.2. Le bisphénol A	30
2.3. Les organotines.....	31
2.4. Les polluants organiques persistants.....	31
2.4.1. Sources d'exposition humaine.....	33
2.4.1.1. Exposition directe ou non alimentaire	33
2.4.1.2. Exposition alimentaire.....	34
2.4.2. Les polychlorobiphényles	34
2.4.3. Le benzo[<i>a</i>]pyrène comme exemple d'hydrocarbure aromatique polycyclique	35
2.4.3.1. Métabolisme du B[<i>a</i>]P	36
2.4.3.2. Absorption.....	37
2.4.3.3. Distribution	37
2.4.3.4. Activation	37
2.4.3.5. Excrétion	39

2.4.3.6. Effets sur la santé	40
2.4.4. Autres exemples de HAP	40
2.4.4.1. Pyrène	40
2.4.4.2. Phénanthrène	40
3. Dyslipidémies	40
3.1. Définition	40
3.2. Les hyperlipidémies	43
3.2.1. Hypertriglycéridémie	43
3.2.2. Hypercholestérolémie	44
II. Le métabolisme des lipoprotéines	45
1. Lipoprotéines	45
1.1. Composants des lipoprotéines	47
1.1.1. Composition lipidique globale	47
1.1.2. Apolipoprotéines	49
1.2. Les différentes classes de lipoprotéines	51
1.2.1. Very low-density lipoprotein	51
1.2.2. Intermediate Density Lipoproteins	52
1.2.3. Low-density lipoprotein.....	52
1.2.4. High density lipoprotein	52
1.2.5. Les chylomicrons	52
2. Le transport des lipoprotéines	52
2.1. Le transport exogène	52
2.1.1. Assemblage et sécrétion des chylomicrons	53
2.1.2. Distribution des chylomicrons	54
2.1.3. Capture des résidus de chylomicrons.....	55
2.2. Le transport endogène	56
2.3. Le transport inverse.....	57
3. Les récepteurs des lipoprotéines.....	58
3.1. La superfamille du LDL-R.....	59
3.1.1. Le récepteur des LDL (LDL-R).....	60
3.1.2. Le VLDL-R	61
3.1.3. Le récepteur <i>lipoprotein receptor-related protein</i> (LRP)	61
3.2. Autres récepteurs des lipoprotéines	62
3.2.1. Les récepteurs éboueurs ou « <i>scavenger receptors</i> » (récepteurs SR).....	62
3.2.2. Le récepteur <i>lipolysis stimulated lipoprotein receptor</i> (LSR)	64

3.2.2.1.	Activation et changement de conformation du LSR.....	66
3.2.2.2.	Implication du LSR dans la clairance des particules riches en TG.....	66
3.2.2.3.	Modulation de l'expression de LSR au niveau hépatique.....	68
3.2.2.4.	Autres rôles du LSR.....	69
III.	Contexte de l'étude et objectifs de la thèse.....	71
	MATERIELS ET METHODES	73
I.	Etudes Animales	74
1.	Animaux utilisés et conditions d'hébergement	74
2.	Traitements.....	74
2.1.	Régimes	74
2.2.	Administration du B[a]P par voie <i>intra-péritonéale (i.p.)</i>	74
3.	Suivi de la prise de poids et de la prise alimentaire.....	74
4.	Prélèvements sanguins	74
5.	Prélèvements tissulaires	75
6.	Extraction lipidique	75
7.	Profil lipoprotéique	75
8.	Analyses biochimiques	76
8.1	Dosages lipidiques.....	76
8.2	Dosage des triglycérides.....	76
8.3	Dosage du cholestérol total.....	76
8.4	Dosage des phospholipides	77
8.5	Dosage des protéines	77
8.5.1	Méthode BCA.....	77
8.5.2	Méthode modifiée de Lowry	78
II.	Les études cellulaires.....	78
1.	Conditions.....	78
2.	Traitements.....	79
2.1.	Exposition aux HAP.....	79
2.2.	Exposition à la lactacystine	79
2.3.	Exposition au B[a]P en présence de chloroquine.....	80
3.	Test de viabilité cellulaire.....	80
3.1.	Test MTT.....	80
3.2.	Test de la calcéine	80
3.3.	Détection des cellules mortes par coloration au bleu de trypan.....	81
III.	Analyse du taux d'expression	82

1.	Expression protéique.....	82
1.1.	Préparation de membranes totales de foie de souris.....	82
1.2.	Préparation des lysats cellulaires	82
1.3.	Western blots.....	83
1.4.	Immunofluorescence.....	85
2.	Expression au niveau de l'ARNm.....	85
2.1.	Extraction des ARNm.....	85
2.1.1.	A partir de cellules Hepa1-6	85
2.1.2.	A partir de foies.....	86
2.2.	Quantification des ARN totaux.....	87
2.3.	Transcription inverse (RT)	87
2.4.	Real-time qPCR.....	87
IV.	Etude de l'activité	88
1.	Purification des lipoprotéines à partir de sérum.....	88
1.1.	Purification des VLDL.....	88
1.2.	Purification des LDL	89
2.	Immunofluorescence	89
2.1.	Préparation de LPDS.....	89
2.2.	Marquage fluorescent des LDL.....	90
2.3.	Modification des LDL par la cyclohexanedione	90
2.4.	Fixation des LDL marquées au LSR	90
2.5.	Effet du B[a]P sur l'interaction entre les Dil-LDL modifiées	92
3.	Préparation de protéines de membranes plasmiques hépatiques enrichies en LSR	92
4.	Interaction entre les lipoprotéines (VLDL et LDL) et les récepteurs LSR et LDL-R par la technique du <i>Ligand blot</i>	93
4.1.	Traitement des VLDL et LDL.....	93
4.2.	Ligand blot	93
V.	Diffusion dynamique de la lumière et mesure du potentiel Zeta.....	94
VI.	Dosage de B[a]P et de ses métabolites dans les échantillons de sérum des souris	95
VII.	ANALYSES STATISTIQUES.....	96
	<i>RESULTATS ET DISCUSSION</i>	97
	<i>CHAPITRE 1</i>	97
I.	Effets des micropolluants sur la viabilité des cellules.....	98
1.1.	L'activité mitochondriale : test MTT	98
1.2.	Calcéine	100

1.3. Coloration au bleu de trypan	100
1.4. Bilan des tests de viabilité	103
II. Effets du B[a]P, du pyrène et du phénanthrène sur l'expression du LSR, du LDL-R et de l'ABCA1	105
III. Effets du B[a]P, du pyrène et du phénanthrène sur l'activité LSR dans les cellules Hepa1-6.....	107
3.1. Mise au point des conditions expérimentales : influence de la concentration en oléate 107	
3.2. Effet du B[a]P, du phénanthrène et du pyrène sur la fixation des Dil-CHD-LDL sur le récepteur LSR exprimé à la surface de cellules Hepa 1-6.	109
IV. Conclusion.....	113
<i>RESULTATS ET DISCUSSION</i>	114
<i>CHAPITRE 2</i>	114
<i>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</i>	158
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	164

A

Mes parents,

Mon fils, Nikan,

Ma Femme, Mona,

Mes sœurs

Remerciements

A l'issue de la rédaction de ce travail de recherche, je suis persuadé que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate de «l'apprenti-chercheur». Je souhaite remercier en premier lieu mon directeur de thèse, Mme Pr Catherine CORBIER, Professeur de Universités de Lorraine. J'ai eu la chance et c'était la meilleure chance de ma vie que m'a accordée le Pr Catherine CORBIER avec son grand cœur en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour m'avoir conseillé, encouragé et soutenu tout au long de la thèse avec patience et disponibilité, et pour la confiance qu'elle m'a accordée et l'aide apportée à la rédaction de ce manuscrit. Elle est l'une des personnes les plus gentilles que j'ai rencontrées dans ma vie. Je ne vous oublierai jamais, merci pour tout et je souhaite pour vous toujours la santé et le bonheur.

J'adresse de chaleureux remerciements à mon co-directeur de thèse, Mme Dr Frances YEN POTIN directrice de l'équipe BFLA, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et pour son attention de tout instant sur mes travaux, et ses conseils avisés et son écoute qui ont été prépondérants pour la bonne réussite de cette thèse, et sans qui cette thèse n'aurait pas été possible. Son énergie et sa confiance ont été des éléments moteurs pour moi. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec elle. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral.

Je suis très honoré que M. le Professeur Mustapha CHERKAOUI MALKI et M. le Professeur Jean-Marc LACORTE aient accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je les remercie vivement pour leur disponibilité et le temps qu'ils m'auront consacré. C'est également un très grand honneur d'avoir comme membres du jury, Mme le Professeur Marie-Christine CHAGNON, et M. le Professeur Michel LINDER, que je remercie d'avoir accepté de participer à ce jury.

Je tiens à adresser mes remerciements à M. Le Professeur Guido RYCHEN, Directeur de l'UR AFPA pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, ainsi qu'à M. le Professeur Cyril FEIDT, **Directeur** de l'équipe MRCA pour son accueil et ses conseils à mes travaux.

Je tiens à remercier vivement Mme le Professeur Annie DARY pour m'avoir permis de réaliser les expériences de purification des protéines dans son équipe (PB2P). Je souhaite remercier

également M. le Dr Jean-Michel GIRARDET pour m'avoir transmis de précieuses connaissances en FPLC et pour m'avoir conseillé et guidé avec bienveillance.

J'adresse également mes sincères remerciements aux Docteurs Marie-Claire LANHERS, Henri SCHROEDER, Samina AKBAR et Nazir AHMAD pour m'avoir guidé avec bienveillance lors des expérimentations animales et pour leur énergie et leur disponibilité.

Je souhaite également remercier tous les membres de l'équipe BFLA : Pr. Jean-Luc OLIVIER, Pr Thomas CLAUDEPIERRE, Dr. Thierry OSTER, Dr Catherine Malaplate-Armand, Dr. Lynn PAURON, Marion HUGUET, Anthony PINCON, Laurent ROYER, Julie COLIN, Mélanie THOMAS, Sandra PELLEIEUX et Timothée BICHET pour leur enthousiasme, leur sympathie et leur soutien, et je tiens également à remercier tout particulièrement plusieurs amis qui m'ont aidé pour ce travail.

Pour terminer, je souhaite remercier infiniment ma famille : ma chère épouse Mona pour son soutien quotidien indéfectible et son enthousiasme contagieux à l'égard de mes travaux comme de la vie en général. Elle m'a porté bonheur et m'a accompagné de son sourire. Elle m'a supporté durant tout ce temps et je sais combien la fin de ma thèse a été dure pour tous les deux. Je mesure à présent la chance que j'ai eue de partager ma vie avec cet ange, et de vivre tous les deux en compagnie de notre jeune fils Nikan. Enfin, ces remerciements ne sauraient être complets sans dire un « grand merci » à mes parents qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans ma volonté de faire une thèse. Ils ont toute ma reconnaissance et ma gratitude.

Liste des abréviations

ABCG1	<i>ATP-binding cassette sub-family G member 1</i>
ABCA1	<i>ATP-binding cassette transporter ABCA1</i>
ACAT	<i>Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
AG	Acide gras
AGL	Acide gras libre
AGNE	Acides gras non estérifiés
AGPAT	1-acylglycérol-3-phosphate-O-acyltransférase
AGPI	Acides gras polyinsaturés
AHR	<i>Aryl hydrocarbon receptor</i>
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
ANP	<i>Atrial natriuretic peptide</i>
APO	Apolipoprotéine
APS	Persulfate d'ammonium
ARNT	<i>Aryl hydrocarbon nuclear translocator</i>
ATGL	<i>Adipose triglyceride lipase</i>
B[a]P	Benzo[a]pyrène
BPA	Bisphénol A
BPC	Biphényle polychloré
BPDE	7, 8 - dihydrodiol-9,10-époxyde
BSA	Sérumalbumine bovine
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>
Calcéine-AM	Calcéine-acétoxyméthylester
CD36	<i>Cluster of Differentiation 36</i>
CDC	Centers for Disease Control
CDT	<i>Clostridium Difficile Transferase</i>
CE	Ester de cholestérol
CEE-ONU	Commission Economique des Nations Unies pour l'Europe
CETP	Protéine de transfert des esters de cholestérol
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylammonio]-1-propanesulfonate
CHD	Cyclohexanedione

ChREBP	<i>Carbohydrate response element-binding protein</i>
CITEPA	Centre interprofessionnel technique d'étude de la pollution atmosphérique
CL	Cholestérol libre
CM	Chylomicrons
CMC	Carboxyméthylcellulose
CMR	Résidus de chylomicrons (ou <i>remnants</i>)
CRTL	Capacité de transport à longue distance
CST	<i>Clostridium spiroforme</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DDE	Dichlorodiphényldichloroéthylène
DG	Diglycérides
DGAT	Diacylglycérol acyltransférase
DHD	Dihydrodiol déshydrogenase
Dil	1,1'-dioctadécyl-3, 3,3', 3'-tétraméthylindocarbocyanine perchlorate
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	Désoxynucléotides triphosphates
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>
DT2	Diabète de type 2
EDCs	<i>Endocrine-disrupting chemicals</i>
EDTA	Acide éthylènediaminetétracétique
EGF	Facteur de croissance épidermique
EH	<i>Epoxide hydrolase</i>
ERK	<i>Extracellular-signal-regulated kinase</i>
FABP	<i>Fatty acid binding proteins</i>
FABPpm	<i>Plasma membrane-fatty-acid-binding protein</i>
FAS	Acide gras synthase
FAT	<i>Fatty acid translocase</i>
FATP	<i>Fatty acid transport protein</i>
FH	Fibroblastes humains
GH	Hormone de croissance
GPAT	Glycérol-3-phosphate acyltransférase
GRAS	<i>Generally regarded as safe</i>

GST	Glutathion S-transférase
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HDL	Lipoprotéines de haute densité
HDL-C	HDL- cholestérol
HL	Lipase hépatique
HMGCR	3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA-réductase
hprt	Hypoxanthine guanine PhosphoRibosylTransférase
HSL	<i>Hormone-sensitive lipase</i>
IDL	<i>Intermediate density lipoprotein</i>
IL-6	Interleukine-6
IMC	Indice de masse corporelle
ITEQ	Equivalents Toxiques Internationaux
LCAT	lécithine cholestérol acyltransférase
LDL	LDL-cholestérol
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
LDL-c	Lipoprotéines de faible densité
<i>LDL-R</i>	<i>LDL-Receptor</i>
LP(a)	Lipoprotéine (a)
LPDS	<i>lipoprotein-deficient serum</i>
LPL	<i>Lipoprotein Lipase</i>
LQs	Limites de quantification
LRP	<i>LDL receptor-related protein</i>
LSR	<i>Lipolysis stimulated lipoprotein receptor</i>
LXR α	<i>liver X receptor α</i>
MAP kinase	Mitogen activated protein kinase
MDR	<i>multi-drug resistance</i>
MEGF7	Multiple epidermal growth factor-type repeat containing protein 7
MG	Monoglycérides
MGAT	Acyl-CoA: monoacylglycérol acyltransférase
MSTFA	N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide
MTP	<i>Microsomal triglyceride transferase</i>
MTT	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
NCEP ATP III	<i>National Cholesterol Education Program-Third Adult Treatment Panel III</i>

NHANES	Health and Nutrition Examination Study
NIHES	<i>National Institute of Health Sciences</i>
NNAL	4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol
NPC1L1	<i>Niemann-Pick C1 like 1</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
P450	cytochrome P450
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PAI-1	Plasma plasminogen activator inhibitor-1
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PC	Phosphatidylcholine
PCB	Polychlorobiphényle
PCDD / F	<i>Polychlorobenzodioxines / polychlorodibenzofuranes</i>
PCN	Naphtalènes polychlorés
PCSK9	<i>Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9</i>
PE	Perturbateurs endocriniens
PFOA	Acide perfluorooctanoïque
PL	Phospholipides
PMSF	Phénylméthylsulfonyle
POD	Péroxydase
POP	Polluants organiques persistants
PPAR	<i>Peroxisome proliferative-activated receptor</i>
RCT	Transport inverse du cholestérol
RE	Réticulum endoplasmique
REST	<i>Relative Expression Software Tool</i>
RIPA	<i>Tampon pour dosage par radioimmunoprecipitation</i>
RME-2	<i>receptor-mediated endocytosis-2</i>
RT	Transcription inverse
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
SM	Sphingomyéline
SNC	Système nerveux central
SORLA	<i>Sortilin-related receptor with A-type repeats</i>
SR-BI	Récepteur scavenger de classe B type I

SREBP	<i>Sterol regulatory element-binding protein</i>
SR	<i>Scavenger receptor</i>
TBT	Tributyltine
TEMED	N, N, N', N'-tétraméthyl-éthylènediamine
TG	Triglycérides
TJ	<i>Tight junctions</i> (jonctions serrées)
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor -α</i>
TRL	Lipoprotéines riches en triglycérides
UGT	UDP-glucuronosyl transférase
VitE	Vitamine E
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>
VLDL-R	Récepteur de VLDL
WCIF	<i>Wright Cell Imaging Facility</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

Liste des figures

Figure 1 : Gènes de susceptibilité à l'obésité et traits associés.	26
Figure 2 : Structure chimique des polychlorobiphényles.....	34
Figure 3 : Structure chimique de quelques HAP.....	35
Figure 4 : Représentation schématique de la voie de signalisation AhR.	38
Figure 5 : Représentation de plusieurs étapes impliquées dans le métabolisme du B[a]P en métabolites réactifs sous l'action des enzymes de phase I et de phase II.	39
Figure 6 : Rôle du foie dans l'élimination et la distribution des lipoprotéines.	42
Figure 7 : Classification des lipoprotéines.	46
Figure 8 : Structure des lipoprotéines.	46
Figure 9 : Assemblage intracellulaire des lipoprotéines riches en triglycérides (chylomicrons et VLDL.).....	54
Figure 10 : Métabolisme général des lipoprotéines.	58
Figure 11 : Famille des récepteurs LDL-R.	59
Figure 12 : Représentation schématique de la sous-unité α et des régions absentes dans les sous-unités α' et β , suite au mécanisme d'épissage alternatif.	65
Figure 13 : Capture des lipides alimentaires sous forme de chylomicrons pendant la phase postprandiale..	67
Figure 14 : Schéma illustrant l'effet de la leptine sur l'expression du LSR.	69
Figure 15 : Modèle de l'organisation des jonctions tricellulaires serrées et rôle du LSR.	70
Figure 16: Effets du traitement par le B[a]P, le pyrène et le phénanthrène sur la viabilité des cellules Hepa 1-6 déterminés par le test au MTT	99
Figure 17: Effets du B[a]P, du pyrène et du phénanthrène sur la viabilité des cellules Hepa 1-6 déterminée par un test à la calcéine.....	101
Figure 18: Effets du traitement par le B[a]P, le pyrène et le phénanthrène sur la viabilité des cellules Hepa 1-6 (test au bleu de trypan).....	102

Figure 19: Principe de base de l'analyse du test à la calcéine et en présence d'un compétiteur pour la MDR.	104
Figure 20: Effet du B[a]P, du pyrène et du phénanthrène sur le niveau d'expression protéique du LSR, du LDL-R et de l'ABCA1 dans les cellules Hepa 1-6.....	106
Figure 21: Images d'immunofluorescence montrant l'effet de l'oléate sur la fixation de Dil-CHD-LDL au LSR exprimé à la surface de cellules Hepa 1-6.....	108
Figure 22: Effet de la concentration en oléate sur l'intensité du signal de fluorescence illustrant la fixation de Dil-CHD-LDL au LSR exprimé à la surface des cellules Hepa 1-6.....	109
Figure 23: Effet du B[a]P, du pyrène et du phénanthrène sur la fixation de Dil-CHD-LDL sur le LSR exprimé à la surface de cellules Hepa1-6.....	110
Figure 24: Analyses quantitative des images d'immunofluorescence montrant l'effet du B[a]P, du pyrène et du phénanthrène sur la fixation des Dil-CHD-LDL.	111

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification du surpoids et de l'obésité en fonction de l'indice de masse corporelle	21
Tableau 2 : Principaux obésogènes connus ou présumés.....	29
Tableau 3 : Dyslipidémies ayant une cause génétique.....	41
Tableau 4 : Propriétés physiques et compositions lipidiques des classes de lipoprotéines. ...	48
Tableau 5 : Composition en acides gras.....	48
Tableau 6 : Identité, expression tissulaire, distribution plasmatique et fonction des principales apolipoprotéines humaines.....	50
Tableau 7 : Description des anticorps utilisés et conditions de Western blot.....	84
Tableau 8 : Primers spécifiques utilisés pour la PCR quantitative	88

AVANT-PROPOS

L'obésité est une maladie multifactorielle dans laquelle interviennent des facteurs génétiques, des facteurs sociaux-économiques, des facteurs métaboliques et endocriniens, ainsi que des facteurs propres à l'individu tels que l'âge, le sexe ou le groupe ethnique. De nombreux arguments plaident aujourd'hui en faveur d'un rôle des polluants organiques persistants (POP) dans le développement de maladies métaboliques et de l'obésité. En effet, une corrélation a été établie entre l'exposition aux polluants et le taux d'obésité (Heindel and vom Saal, 2009; Schug *et al.*, 2011). De plus, les POP ont été répertoriés comme perturbateurs endocriniens et sont maintenant connus pour induire une augmentation de l'adipogenèse (Hao *et al.*, 2012; Sargis *et al.*, 2010). Cependant, leur contribution reste difficile à évaluer en raison du caractère multifactoriel de ces maladies et les mécanismes impliqués ne pas complètement élucidés.

Le choix de ce sujet de thèse répondait à une volonté commune de bâtir une interface thématique entre l'équipe MRCA (Micropolluants et Résidus dans la Chaîne Alimentaire) et le laboratoire LIPIDOMIX, qui a rejoint l'UR AFPA en 2013 en tant que nouvelle équipe (BFLA) de ce laboratoire.

L'équipe MRCA s'intéresse au transfert des micropolluants persistants présents dans l'environnement vers la matrice alimentaire, à leur biodisponibilité et aux effets neurotoxiques de ces molécules à des doses faibles et représentatives de l'exposition naturelle. Par ailleurs, l'équipe BFLA s'intéresse aux facteurs permettant le maintien de l'homéostasie lipidique aussi bien au niveau central qu'au niveau périphérique, puisque des perturbations de l'homéostasie lipidique peuvent contribuer au développement de maladies telles que par exemple, l'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires, l'obésité, le diabète, ou à des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou la dégénérescence maculaire. Elle focalise essentiellement ses études sur le rôle d'un récepteur de lipoprotéines, le *Lipolysis Stimulated lipoprotein Receptor*, dont l'expression et l'activité ont une influence directe sur la biodisponibilité des lipides alimentaires et donc, sur les fonctions cellulaires, aussi bien au niveau central que périphérique.

Alors que la plupart des études consacrées à l'effet des polluants sur la prise de poids se sont consacrées sur le rôle de ces composés sur l'adipogenèse, nous avons porté nos efforts sur le métabolisme lipidique au niveau hépatique, car le foie est l'organe qui joue le rôle central dans la régulation du statut lipidique, à la fois par sa capacité de synthèse *de novo* et aussi pour le fait que qu'il constitue le site de catabolisme des lipides, sous forme des lipoprotéines. Les objectifs de ce travail (qui seront présentés plus en détail dans le paragraphe III de

l'introduction) étaient donc d'évaluer l'effet de l'exposition à différents POP sur le métabolisme lipidique, et sur l'expression et l'activité de récepteurs des lipoprotéines et de transporteurs hépatiques.

Le premier chapitre de cette thèse est consacré à une étude bibliographique, dont la première partie présente les dérégulations du métabolisme lipidique et l'effet des substances obésogènes incluant les POP. La seconde partie de cette synthèse bibliographique porte sur le métabolisme des lipoprotéines.

Le second chapitre de ce manuscrit est consacré à la description du matériel et des méthodes expérimentales utilisés.

Le troisième chapitre détaille et discute les résultats obtenus, avec d'abord les études préliminaires qui ont conduit à sélectionner le benzo[*a*]pyrène pour la suite des travaux et à déterminer les doses suffisantes pour avoir un effet biologique sans entraîner d'effets toxiques pour les cellules dans nos conditions d'expérience. La seconde partie des résultats est constituée de la publication issue de la poursuite de ces travaux, et présente les résultats obtenus par des approches utilisant des modèles cellulaires ou animaux, qui ont permis de décrire et d'expliquer l'effet du benzo[*a*]pyrène sur l'expression ou l'activité des récepteurs de lipoprotéines hépatiques, et sur le statut lipidique *in vivo* chez la souris.

Le dernier chapitre présente les conclusions et perspectives qui découlent de ce travail.

INTRODUCTION

I. Dérégulation du métabolisme lipidique

1. Obésité, définition et conséquences en termes de santé publique

En général, l'obésité résulte d'un déséquilibre chronique entre l'apport énergétique et la dépense d'énergie. Ce déséquilibre conduit à une augmentation de la taille des adipocytes (hypertrophie) (Tanner, 1955) ou à une augmentation de leur nombre (hyperplasie) (Steinberg *et al.*, 1962 ; Enesco and Leblond, 1962) et résulte en un gain de poids, le plus souvent sous forme de graisse. L'obésité est définie par un Indice de Masse Corporelle (IMC) supérieur à 30. Cet indice, défini par l'OMS se calcule en fonction de la taille (m) et de la masse (kg) d'un individu (Tableau 1) par la formule : $IMC = \text{masse}/(\text{taille})^2$ (Keen *et al.*, 1979 ; Kuczmarski *et al.*, 1997). Cependant, d'autres approches permettent le calcul de la graisse viscérale, telles que la mesure du tour de taille ou le rapport entre le tour de taille et le tour de hanches (Krotkiewski *et al.*, 1983).

Tableau 1 : Classification du surpoids et de l'obésité en fonction de l'indice de masse corporelle

(d'après <http://www.who.int/features/factfiles/obesity/facts/en/>)

Insuffisance pondérale	< 18,5
Eventail normal	18,5 - 24,9
Surpoids	25,0 - 29,9
Obésité	≥ 30
Obésité, classe I	30,0 – 34,9
Obésité, classe II	35,0 – 39,9
Obésité, classe III	≥ 40,0

L'obésité est une maladie multifactorielle qui touche pratiquement tous les âges, les sexes, les groupes socio-économiques, et a de graves répercussions sociales et psychologiques. En outre, l'obésité et le surpoids contribuent majoritairement à différentes maladies chroniques, dont le diabète de type 2 (DT2), l'hyperinsulinémie et la résistance à l'insuline, les maladies coronariennes, l'hypertension artérielle, les accidents vasculaires cérébraux, la goutte, la stéatose hépatique, l'asthme, ainsi qu'à des troubles pulmonaires, de la vésicule biliaire, de la reproduction, à des maladies rénales, au développement de l'arthrose, et à certaines formes de cancers (Mokdad *et al.*, 1999 ; Mokdad *et al.*, 2003 ; Collins, 2005). L'obésité pose donc un problème de santé publique important, notamment dans les pays industrialisés.

Au cours des dernières décennies, la prévalence de l'obésité a augmenté très fortement dans les pays industrialisés riches, mais aussi dans les pays en voie de développement les plus pauvres où elle coexiste souvent avec la sous-nutrition (Caballero, 2007 ; Cunningham, 2010). Les « *Centers for Disease Control* » (CDC) ont rapporté que l'obésité avait atteint des proportions épidémiques et alarmantes, plus de 60 % des adultes américains étant obèses ou en surpoids en 2009-2010 (Ogden *et al.*, 2012)

En 2009, 31,9 % des Français adultes de 18 ans et plus étaient en surpoids ($25 \leq \text{IMC} < 30 \text{ kg/m}^2$) et 14,5% étaient obèses ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) (ObEpi, 2009). En 2012, le pourcentage de Français adultes en surpoids atteignait 32,3% et 15% présentaient une obésité ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) (ObEpi, 2012). Des statistiques similaires ont été établies dans de nombreux pays européens, du Moyen-Orient, en Australie et en Chine.

Ce phénomène a des impacts significatifs sur la collectivité en ce qui concerne les coûts liés au traitement de la maladie et de ses complications (assistance médicale personnelle, assistance hospitalière, services sanitaires et médicaments). Les coûts directs liés à l'obésité représentent une part comprise entre 2 et 8 % du total des coûts sanitaires au niveau mondial ; la dépense sanitaire pour une personne obèse est en moyenne de 25 % plus élevée que celle d'une personne de poids normal (Withrow and Alter, 2011). Le coût médical annuel estimé de l'obésité aux États-Unis était de 147 milliards de dollars en 2008, les frais médicaux pour les personnes obèses étaient 1,43 fois plus élevés que pour celles de poids normal (Finkelstein *et al.*, 2009). En France, le coût annuel de la prise en charge de l'obésité par l'assurance maladie en 2008 était de 4 milliards d'euros et de 10 milliards d'euros si on ajoute le surpoids. Ces montants représentent respectivement un peu plus de 3 % et près de 7 % de l'objectif national des dépenses d'assurance maladie (ONDAM) pour 2008 (Boyer, 2008).

1.1. L'hyperplasie

L'adipogenèse est considérée comme le processus dominant en début de vie, car le nombre d'adipocytes augmente dans le corps humain pendant la vie prénatale et postnatale précoce. Il est fixe à la fin de l'enfance ou à l'adolescence (Knittle *et al.*, 1979), l'extension du tissu adipeux à l'âge adulte survient principalement *via* l'hypertrophie adipocytaire, et une forte corrélation est observée entre le diamètre des adipocytes et l'IMC des adultes (Spalding *et al.*, 2008). L'adipogenèse est un procédé à plusieurs étapes qui commence par la prolifération des cellules souches mésenchymateuses qui ont la capacité à la fois s'auto-renouveler et de se différencier

en plusieurs lignées (myocytes, ostéocytes ou adipocytes blancs / bruns). Il est maintenant bien établi qu'il existe des cellules souches dans le tissu adipeux (Zuk *et al.*, 2001) et qu'un excès de leur recrutement participe à l'hyperplasie du tissu adipeux observée dans l'obésité sévère.

Les principaux événements menant à la différenciation terminale des pré-adipocytes en adipocytes ont été caractérisés ces dernières années par l'identification des facteurs de transcription qui jouent un rôle de régulation dans le processus de différenciation. Les facteurs de transcription caractérisés comme étant les plus importants dans le développement des adipocytes matures sont membres des *CCAAT/enhancer binding proteins* (C/EBPs) et de la famille des *peroxisome proliferative-activated receptors* (PPARs) (Rosen *et al.*, 2000). Plusieurs éléments indiquent que PPAR γ joue un rôle clé dans l'adipogenèse. PPAR γ , qui est plus abondant dans les adipocytes que dans d'autres types cellulaires, est un déclencheur de la différenciation terminale des préadipocytes en adipocytes (Tontonoz *et al.*, 1995).

1.2. L'hypertrophie

L'hypertrophie des adipocytes est due à l'accumulation de triglycérides (TG) dans l'adipocyte, soit *via* l'absorption des acides gras à partir des chylomicrons (CM) ou des lipoprotéines de très basse densité (VLDL) en circulation, ou par la lipogenèse *de novo* (synthèse de TG à partir des acides gras). Ces procédés permettent au tissu adipeux de stocker des quantités prodigieuses d'énergie, qui représentent 10-15 kg de poids corporel chez un adulte jeune maigre et plus de 130.000 kcal ou 200 repas (Large *et al.*, 2004).

La majorité des acides gras utilisés pour la synthèse des TG dans les adipocytes sont dérivés des triglycérides plasmatiques, suite à l'action de la *Lipoprotein Lipase* (LPL) qui hydrolyse les acides gras sur le squelette de glycérol. L'expression et l'activité de la LPL dans le tissu adipeux sont augmentées après un repas et stimulées par l'insuline (Mead *et al.*, 2002). L'absorption des acides gras (AG) est régulée par des transporteurs dont CD36/FAT, la protéine de transport des acides gras (FATP), et la *fatty-acid-binding protein* (FABPpm). Une quantité accrue de CD36/FAT à la membrane plasmique pourrait contribuer à l'accumulation de lipides dans les adipocytes (Luiken *et al.*, 2001).

La régulation de la lipogenèse dans le tissu adipeux n'est pas aussi bien caractérisée que dans le foie, où elle est stimulée par le glucose, l'insuline et le glucagon, et inhibée par les acides gras polyinsaturés (AGPI). Au niveau de la transcription, les effets de l'insuline et du glucose

pour activer l'acide gras synthase (FAS) sont médiés par la *sterol regulatory element-binding protein 1c* (SREBP-1c) et la *carbohydrate response element-binding protein* (ChREBP), tandis que les effets inhibiteurs des AGPI sont médiés par un récepteur nucléaire, le *liver X receptor α* (LXR α). Bien que SREBP-1c, ChREBP et LXR α soient exprimés dans le tissu adipeux, il n'est pas clair si ces protéines y sont régulées de la même manière que dans le foie. Par exemple, une alimentation riche en glucides augmente l'expression des gènes de la lipogenèse deux à trois fois dans le foie, mais pas dans les tissus adipeux. A l'inverse, une alimentation riche en lipides réduit l'expression des gènes de la lipogenèse dans le foie, mais pas dans le tissu adipeux (Diraison *et al.*, 2002 ; Letexier *et al.*, 2003). A la fin de la synthèse des acides gras et de la glycéronéogenèse, les AG sont estérifiés par le glycérol-3-phosphate pour former des TG par l'intermédiaire des actions séquentielles de la glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT) qui permet l'obtention des monoglycérides (MG), de la 1-acylglycérol-3-phosphate-O-acyltransférase (AGPAT) qui permet la synthèse des diglycérides (DG), et de la diacylglycérol acyltransférase (DGAT) qui conduit aux TG (Large *et al.*, 2004).

Le taux de lipolyse du tissu adipeux - hydrolyse des TG en glycérol et acides gras libres- est un facteur déterminant de la taille des adipocytes et de la masse adipeuse. L'*Hormone-Sensitive Lipase* (HSL), découverte en 1960 et ainsi nommée en raison de sa régulation par l'insuline et les catécholamines, a longtemps été présumée être la seule enzyme impliquée dans la lipolyse du tissu adipeux (Hollenberg *et al.*, 1961 ; Vaughan *et al.*, 1964) Cependant, il a été proposé que d'autres enzymes y contribuent également. Ainsi, la lipase des TG adipeux (*Adipose Triglyceride Lipase* ou ATGL) a été identifiée en 2004 comme une seconde hydrolase de triglycérides qui exerce une action indépendante de celle de la HSL dans les adipocytes (Zimmermann *et al.*, 2004). L'ATGL hydrolyse plus spécifiquement les TG pour lesquelles elle a la plus forte affinité, tandis que la HSL peut hydrolyser les TG, les DG et les MG, même si son affinité est plus forte pour les DG (Zimmermann *et al.*, 2009). L'HSL et l'ATGL sont régulées par le statut hormonal et nutritionnel. Pendant le jeûne ou la famine, l'HSL et l'ATGL hydrolysent les TG pour libérer des acides gras et du glycérol pour la production d'énergie par d'autres tissus. Les catécholamines et les agonistes des récepteurs β -adrénergiques agissant par l'intermédiaire de l'AMPc (Steinberg and Huttunen, 1972) sont les déclencheurs classiques de la lipolyse du tissu adipeux, mais des voies de signalisation supplémentaires – impliquant notamment l'hormone de croissance (GH) (Goodman and Kostyo, 1981), l'*AMP-activated protein kinase* (Rossmeisl *et al.*, 2004), la MAP kinase (Soeder *et al.*, 1999), l'*extracellular-signal-regulated kinase* (ERK) (Juan *et al.*, 2005), l'*atrial natriuretic peptide* (ANP) (Sengenès

et al., 2000), la thyrotropine (Gagnon *et al.*, 2010), (Marcus *et al.*, 1988), et le TNF- α (Cawthorn and Sethi, 2008) - sont aussi de puissants médiateurs de la lipolyse. En revanche, l'insuline en est un puissant inhibiteur (Moskowitz and Fain, 1969).

Ces réserves d'énergie peuvent être mobilisées par la lipolyse pendant le jeûne à court et à long terme. Ainsi, l'équilibre relatif entre l'absorption des lipides, la lipogenèse *de novo*, et la lipolyse détermine la taille des adipocytes, chacun de ces processus étant fortement influencé par les conditions nutritionnelles et hormonales.

1.3. Les causes de l'obésité

Les causes de l'obésité sont clairement multifactorielles. Bien que les principaux déterminants de l'obésité aient été fortement débattus, il est maintenant établi que cette maladie résulte d'une combinaison de facteurs génétiques, physiologiques, sociaux, environnementaux et comportementaux. Les déterminants multiples de l'obésité augmentent la difficulté à traiter cette maladie. Traditionnellement, l'augmentation de l'obésité est attribuable à une augmentation de l'apport calorique et à une réduction concomitante significative de l'activité physique et de la dépense énergétique (Prentice, 2001). Cependant, ceci n'explique pas entièrement l'ampleur de l'épidémie actuelle. Les raisons de cette forte augmentation de l'obésité ou du surpoids ne sont pas bien comprises, mais plusieurs facteurs, y compris les infections, les régimes à haute teneur en fructose, la génétique / l'épigénétique, l'augmentation de l'âge maternel, la manque de sommeil, l'utilisation de certains produits pharmaceutiques et la présence de certains produits environnementaux ont tous été proposés comme causes potentielles (McAllister *et al.*, 2009). Ainsi, il est postulé que certaines substances chimiques puissent jouer un rôle causal dans le développement de l'obésité (Baillie-Hamilton, 2002).

1.3.1. Les causes génétiques

De nombreuses études ont été réalisées concernant l'influence de la génétique sur l'obésité (Figure 1). Il a été montré que le risque relatif d'être obèse augmente avec le nombre de parents au premier degré obèses (Whitaker *et al.*, 1997). Il est généralement admis que l'obésité chez la plupart des individus est due en partie à des variations de plusieurs gènes (Figure 1). Quelle que soit la contribution génétique à l'obésité, les facteurs non génétiques ne font qu'exacerber la situation.

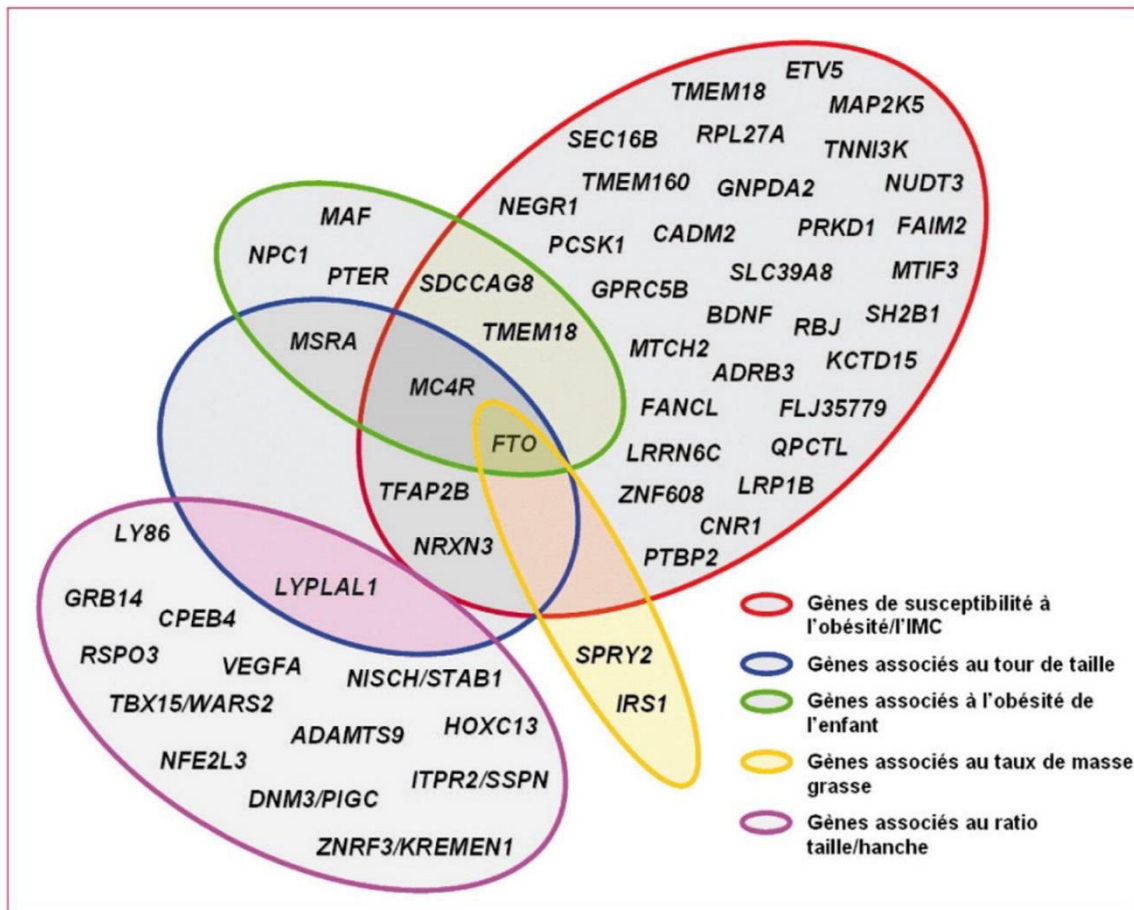


Figure 1: Gènes de susceptibilité à l'obésité et traits associés.
(D'après Bonnefond and Froguel, 2009)

1.3.2. Causes environnementales

Le terme « environnement » couvre tous les domaines allant de la disponibilité alimentaire à la prévalence des maladies infectieuses et aux traitements à disposition.

Les recherches récentes d'un certain nombre de laboratoires dans le monde ont identifié des molécules chimiques qui favorisent le gain de poids et l'adiposité. Une littérature émergente implique maintenant l'exposition *in utero* aux perturbateurs endocriniens (PE) dans la programmation du développement de l'obésité *via* un contrôle altéré du développement du tissu adipeux, du contrôle de la prise alimentaire, du métabolisme, de la sensibilité à l'insuline et du métabolisme des lipides (Grün and Blumberg, 2009 ; Heindel and vom Saal, 2009). Ces perturbateurs endocriniens sont connus pour imiter, améliorer ou inhiber l'action des hormones, d'où le nom qui leur a été attribué. La perturbation endocrinienne est une modulation inappropriée du système endocrinien par des produits chimiques présents dans l'aliment ou

l'environnement. Ceux-ci peuvent interférer avec la synthèse, la sécrétion, le transport, la fixation ou de l'action des hormones naturelles dans le corps qui sont responsables du maintien de l'homéostasie, de la reproduction, du développement, et du comportement (Vos *et al.*, 2000). L'effet de ces substances sur l'action biologique des œstrogènes, de la testostérone et de la thyroxine ont déjà été démontrées et sont en lien avec l'infertilité (Foster *et al.*, 2008) , les changements développementaux (Patisaul and Adewale, 2009) et le cancer (Soto and Sonnenschein, 2010).

1.4. Les substances obésogènes

Récemment, il a été démontré que les PE exerçaient une influence sur le développement des adipocytes (Baillie-Hamilton, 2002 ; Heindel, 2003 ; Heindel and Levin, 2005 ; Newbold *et al.*, 2005 ; Newbold *et al.*, 2007a ; Newbold *et al.*, 2007b ; Newbold *et al.*, 2008). Ces substances ont été appelées "obésogènes", en référence à l'idée qu'ils régulent de façon inappropriée le métabolisme des lipides et l'adipogenèse, et favorisent la prise de poids et l'obésité (Grün and Blumberg, 2006). Les obésogènes exercent leur action en augmentant le nombre de cellules adipocytaires (adipogenèse) ou l'accumulation des lipides dans les cellules adipeuses existantes, en altérant l'action des senseurs métaboliques, en dérégulant la synthèse des stéroïdes sexuels, et en modifiant l'équilibre de la balance énergétique notamment au niveau de la régulation de l'appétit (Grün, 2010).

Le mécanisme le plus couramment proposé est lié à leur capacité à se fixer à des récepteurs nucléaires (Celik *et al.*, 2008 ; Nose *et al.*, 2009 ; Molina-Molina *et al.*, 2013). Les PE peuvent aussi agir en modifiant l'expression de gènes codant pour des protéines stéroïdogènes comme la CYP19 (*aromatase*), la CYP17 (*hydroxylase / lyase*), la CYP11A (*cholesterol side-chain-clivage*) (Skolness *et al.*, 2013) Enfin, un autre mécanisme proposé est la modification de la formation des synapses neuronales (Shinomiya and Shinomiya, 2003) qui pourrait affecter la libération des substances produites par le cerveau et modifier la régulation énergétique centrale. Ces effets peuvent s'exercer individuellement ou en combinaison. En outre, les tissus cibles ne sont pas toujours identifiés, mais plusieurs sites semblent probables, y compris les adipocytes, le cerveau, le foie, l'estomac, le pancréas.

Les substances obésogènes ont diverses origines (Tableau 2).

Tableau 2 : Principaux obésogènes connus ou présumés (adapté de Holtcamp, 2012)

Alimentaires
••Fructose
••Genistéine (isoflavone)
•• Glutamate monosodique
Tabagisme*
••Nicotine
Pharmaceutiques
••Diéthylstilbestrol
••Oestradiol
Produits chimiques industriels
••Bisphénol A (BPA)
••Organotines
••Acide Perfluoro-octanoïque
••Phthalates
••Diphényl étherspolybromés(PBDEs)
Pesticides organophosphorés
••Chlorpyrifos
••Diazinon
••Parathion
Autres polluants environnementaux
••Benzo[a]pyrène
••Finesparticules (PM2.5)
••Plomb
* la fumée de cigarette est aussi source d'exposition au benzo[a]pyrène et au PM2.5.

1.4.1. Les obésogènes pharmaceutiques

Certains médicaments peuvent entraîner des effets secondaires obésogènes qui s'exercent de différentes façons. A titre d'exemple, les études *in vitro* ont montré que les agents pharmaceutiques tels que l'olanzapine peuvent induire l'adipogenèse (Vestri *et al.*, 2007 ; Yang *et al.*, 2007 ; Minet-Ringuet *et al.*, 2007). La chlomipramine est un antidépresseur entraînant un gain de poids et une augmentation de la prise alimentaire chez l'Homme (Calegari *et al.*, 2007), et les antipsychotiques clozapine et olanzapine sont quant à eux connus pour provoquer une hyperphagie et une prise de poids chez l'Homme (Cope *et al.*, 2005).

1.4.2. Obésogènes d'origine alimentaire

1.4.2.1. Le fructose

Le fructose, en raison de ses effets métaboliques, peut être désigné comme un perturbateur endocrinien. Il est capté par le foie, seul responsable de son métabolisme, par un système de transport actif et phosphorylé par une fructokinase. A apport calorique égal, l'administration de fructose à des adultes provoque une accumulation de graisse abdominale associée à une résistance à l'insuline (Bantle, 2009 ; Perez-Pozo *et al.*, 2010). Le fructose augmenterait également la tendance à la stéatose non alcoolique chez l'homme (Lim *et al.*, 2010). Enfin, le fructose provoque une hyperlipidémie, qui diminue le transport de la leptine à travers la barrière hémato-encéphalique, ce qui contribue à la résistance à la leptine et donc interfère avec la régulation de l'appétit (Banks *et al.*, 2004).

1.4.2.2. Le glutamate monosodique

Le glutamate monosodique est un additif alimentaire utilisé comme exhausteur de goût. Il est considéré comme " *generally regarded as safe* "(GRAS) pour l'homme. Sa consommation a augmenté dans le monde au cours des dernières décennies. L'administration néonatale de glutamate monosodique à des modèles animaux entraîne une obésité due à des altérations du système neuroendocrinien qui contrôle le comportement alimentaire (Dawson, 1986) . Chez l'Homme, une étude transversale montre que les personnes qui consomment une moyenne de 0,33 g de glutamate par jour ont tendance à prendre du poids (He *et al.*, 2008).

2. Les polluants environnementaux et leurs effets obésogènes

Certaines substances chimiques obésogènes sont retrouvées dans l'environnement, telles que les composés organostanniques et les xénobiotiques. Ces substances obésogènes regroupent des molécules diverses telles que des dérivés oestrogéniques (par exemple, la génistéine, le diéthylstilbestrol, le bisphénol A), ou d'autres composés tels que l'acide perfluorooctanoïque, la nicotine, le tributylétain, les phtalates, et certains pesticides organophosphorés. En outre, d'autres substances chimiques environnementales ont été associées au développement du diabète chez l'homme, incluant l'arsenic, le cadmium, les dioxines, les biphényles polychlorés (BPC), et d'autres types de composés organiques halogénés (Longnecker and Daniels, 2001 ; Schwartz *et al.*, 2003 ; Tseng, 2004 ; Uemura *et al.*, 2009; Edwards and Prozialeck, 2009).

2.1. Les phtalates

Les phtalates sont une classe de composés ubiquitaires couramment utilisés comme plastifiants tels que le chlorure de polyvinyle. Plusieurs esters de phtalates présentent une toxicité chez l'animal, et ont des effets sur la reproduction et l'obésité (Desvergne *et al.*, 2009). Une étude transversale reliant d'une part, les métabolites urinaires de phtalates et d'autre part, l'IMC et le tour de taille chez l'adulte (Hatch *et al.*, 2010) montre une corrélation positive entre l'IMC ou le tour de taille et les taux urinaires de six métabolites de phtalates, avec un effet plus important chez les hommes âgés de 20-59 ans que pour d'autres groupes de population plus jeunes. Chez les animaux, il a été démontré que les phtalates activaient le PPAR- γ , qui permet de différencier les pré-adipocytes en adipocytes et joue un rôle important dans le développement des cellules adipeuses (Desvergne *et al.*, 2009). Ainsi, un suivi de l'exposition à différentes variétés de phtalates semble nécessaire pour en évaluer l'impact sur la prise de poids pendant l'enfance et l'âge adulte.

2.2. Le bisphénol A

Le bisphénol A (BPA), un composant de plastiques polycarbonates et de résines époxy, retient actuellement l'attention du public et des organismes gouvernementaux en raison de son volume de production élevé (> 800 millions kg par an pour les seuls États-Unis) et l'exposition générale de la population humaine (Zoeller *et al.*, 2005). Le BPA est utilisé dans la fabrication de nombreux produits dont les biberons en polycarbonate (Biles *et al.*, 1997) et les scellants et composites dentaires (Olea *et al.*, 1996), ce qui suggère que l'Homme est régulièrement exposé à cette substance chimique par de nombreuses sources et voies d'exposition. Une indication supplémentaire de l'exposition humaine est donnée par des études signalant des niveaux mesurables de BPA dans l'urine humaine (Calafat *et al.*, 2008) ; le sérum (Takeuchi and Tsutsumi, 2002), le lait maternel (Ye *et al.*, 2006), le plasma maternel et fœtal, le liquide amniotique et les tissus placentaires (Schönfelder *et al.*, 2002 ; Padmanabhan *et al.*, 2008).

Des études chez le rat ont montré une augmentation du poids corporel chez les animaux qui ont été exposés à de faibles doses de BPA pendant le développement prénatal ou néonatal (Rubin *et al.*, 2001 ; Somm *et al.*, 2009). Une étude rapporte des augmentations similaires de poids corporel de chiots dont les mères avaient consommé du BPA ajouté à leur alimentation pendant la gestation, à des doses faibles et considérées comme "écologiquement pertinentes" de 1 pg / kg d'aliment (1 ppb BPA) (Ryan *et al.*, 2010). Des études *in vitro* montrent que le

BPA induit la différenciation des cellules 3T3-L1 (cellules de fibroblastes de souris qui peuvent se différencier en adipocytes) (Sakurai *et al.*, 2004). De plus, le BPA, en combinaison avec l'insuline, accélère la formation des adipocytes (Masuno *et al.*, 2002 ; Masuno *et al.*, 2005). Enfin, de faibles doses de BPA dans l'environnement inhibent l'adiponectine et stimulent la libération d'adipokines inflammatoires telles que l'interleukine-6 (IL-6) et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) à partir de tissu adipeux humain, ce qui suggère que le BPA est impliqué dans l'obésité et le syndrome métabolique qui y est lié (Hugo *et al.*, 2008 ; Ben-Jonathan *et al.*, 2009).

2.3. Les organotines

Les organotines sont une famille de composés qui contiennent au moins une liaison étain-carbone (Sn-C) (Nicholson, 1989). Actuellement, les organoétains (ou composés organostanniques) sont fréquemment utilisés dans l'industrie, par exemple comme fongicides pour la préservation du bois, ou comme stabilisant thermique dans les plastiques de polyoléfines (Piver, 1973). Parce les organotines sont lipophiles, elles s'accumulent facilement dans les bactéries, les algues et les invertébrés aquatiques (Hoch, 2001). Certaines d'entre elles, les tributyltines (TBT), très toxiques pour les algues et divers organismes marins dont les mollusques, ont été très utilisées comme agent de protection du « biofouling » (accumulation de bactéries, plantes ou animaux sur des surfaces humides), dans les peintures des coques de bateaux, par exemple. Elles sont fortement toxiques, rémanentes dans les sédiments et induisent des changements de sexe chez certaines espèces. Ces TBT et leurs produits de dégradation sont à l'origine d'une pollution marine généralisée du littoral français et d'une grande partie des littoraux des pays industrialisés. Les études *in vivo* chez la souris montrent que l'exposition prénatale au TBT pendant la gestation entraîne l'accumulation prématurée de graisse dans les tissus adipeux (Grün *et al.*, 2006).

2.4. Les polluants organiques persistants

Les POP (polluants organiques persistants) présentent des effets toxiques pour la santé humaine et pour la faune. Les POP sont des molécules complexes définies à partir de cinq propriétés : toxicité, lipophilie (Gerde *et al.*, 1993) persistance dans l'environnement, bioaccumulation et transport sur de longues distances (Irigaray *et al.*, 2006). De par leur grande persistance dans l'environnement, ils présentent un fort potentiel de bioaccumulation dans la chaîne alimentaire, et peuvent présenter un degré élevé de toxicité pour la santé humaine et l'environnement. Les

POP se caractérisent par leur capacité de transport à longue distance (CRTL), c'est-à-dire qu'ils peuvent se déposer dans des territoires où ils n'ont jamais été utilisés ou produits, ce qui représente un risque important pour la communauté mondiale.

De manière générale, les POP proviennent de combustions incomplètes. Certains procédés industriels mettant en œuvre une étape de combustion sont donc des émetteurs potentiels. De plus, d'autres sources diffuses, très difficiles à évaluer, ont un effet majeur comme l'incinération des déchets domestiques, le chauffage résidentiel, les feux de décharge, les feux de forêts, les incendies de bâtiments (Irigaray *et al.*, 2006) .

Pour les POP issus des émissions anthropiques, l'inventaire du centre interprofessionnel technique d'étude de la pollution atmosphérique (CITEPA) réalisé en avril 2013 indique une valeur d'émission de 19 tonnes dans l'air en France métropolitaine pour l'année 2011 pour les 4 HAP définis par le Protocole d'Aarhus de 1998 relatif aux POP et par le règlement n°850/2004 du Parlement Européen et du Conseil du 29 Avril 2004, à savoir le benzo(a)pyrène (B[a]P), le benzo(b)fluoranthène, le benzo(k)fluoranthène et l'indéno(1,2,3-cd)pyrène (CITEPA, 2013). L'émission de B[a]P était de 0 et 1,53 ng/m³ d'air en Ile-de France pour l'année 2010, alors que la directive européenne 2004/107/CE fixe pour le B[a]P une valeur limite en moyenne annuelle de 1 ng/m³ et un objectif à long terme de 0,1 ng/m³.

Dans le cadre de la Convention de Stockholm sur les POP signée en 2001, une liste de substances dont la production, l'utilisation et le stockage doivent être éliminés, ou gravement restreints, a été établie. Parmi celles-ci, les dibenzo-p-dioxines, les PCDD/F et les polychlorobiphényles (PCB) ont été inclus dans la liste initiale des produits chimiques, communément appelés la «sale douzaine». Cependant, ces dernières années, un certain nombre d'autres produits chimiques ont également été catalogués comme des POP, et sont venus agrandir cette liste, et des polluants tels que les naphthalènes polychlorés (PCN) ou des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), qui étaient déjà mentionnés dans le Protocole de la Commission Economique des Nations Unies pour l'Europe (CEE-ONU) Protocole, ont été également proposés (Nadal *et al.*, 2011).

Le nombre d'études visant à surveiller les niveaux des polluants organiques persistants dans l'environnement a augmenté progressivement. En outre, ces enquêtes ont été utilisées pour évaluer l'exposition humaine à ces polluants organiques, ainsi que pour estimer le pourcentage de l'exposition totale apporté par la prise alimentaire. Un certain nombre d'études a identifié la

consommation d'aliments comme étant la voie la plus importante de l'exposition aux POP (notamment les PCDD/F et PCB), avec des contributions supérieures à 95% (Linares *et al.*, 2010).

En ce qui concerne les POP tels que les HAP et les PCN, l'inhalation a également été soulignée comme étant la plus contributive des voies d'exposition directe (Nadal *et al.*, 2011), mais elle reste toujours mineure par rapport à l'apport alimentaire (Martí-Cid *et al.*, 2008a ; Martí-Cid *et al.*, 2008b ; Kimbrough *et al.*, 2010).

2.4.1. Sources d'exposition humaine

Au cours de leur vie, les individus peuvent être exposés à un large éventail de polluants organiques persistants qui pénètrent dans le corps humain par différentes voies.

2.4.1.1. Exposition directe ou non alimentaire

L'inhalation de l'air. Cette voie est la plus importante pour les composés organiques volatils comme le benzène et le formaldéhyde, entre autres.

L'ingestion de sol. Le contact avec les sols contaminés peut devenir une voie importante d'exposition à des produits chimiques organiques, et pose des risques de santé importants, à long terme, au travers de différentes activités (par exemple, main portée à la bouche par les jeunes enfants, jardinage par des adultes, nettoyage des sols et dépoussiérage) (Kimbrough *et al.*, 2010). Pour certaines catégories de polluants organiques tels que les POP, l'ingestion accidentelle de sol contaminé est la principale voie d'exposition non alimentaire (Rostami and Juhasz, 2011).

L'absorption cutanée. L'exposition à certains composés organiques par la voie cutanée s'effectue par l'eau et le sol. Ce processus peut être divisé en trois étapes (*i*) la migration de la source dans l'air et sur les surfaces exposées, (*ii*) la migration dans les lipides de la surface de la peau et (*iii*) la migration à partir de la surface de peau à travers la couche cornée (*Stratum corneum*) et l'épiderme, puis dans le tissu corporel (Ferré-Huguet *et al.*, 2009 ; Weschler and Nazaroff, 2012).

2.4.1.2. Exposition alimentaire

Un certain nombre d'études ont montré que la prise alimentaire était la voie d'entrée principale des POP et d'autres produits chimiques organiques dans le corps humain (Martí-Cid *et al.*, 2008a ; Cornelis *et al.*, 2012 ; Domingo, 2012 ; Perelló *et al.*, 2012). Elle représente plus de 90% de l'exposition totale (Linares *et al.*, 2010 ; Noorlander *et al.*, 2011). Cependant, l'exposition liée à la consommation d'eau du robinet contaminée reste un sujet de préoccupation (López *et al.*, 2008).

En ce qui concerne les HAP, il existe 2 principales voies d'entrée dans la chaîne alimentaire. La première concerne la contamination des aliments par des HAP présents dans l'air, le sol ou l'eau. La seconde correspond aux HAP formés pendant les traitements technologiques (séchage, fumage) ou simplement pendant la cuisson des aliments. Par exemple, le taux de B[a]P atteint jusqu'à 4 ng/g dans les steaks grillés au barbecue et jusqu'à 0,5 ng/g dans certaines céréales (Kazerouni *et al.*, 2001).

2.4.2. Les polychlorobiphényles

Les polychlorobiphényles (PCB) sont des hydrocarbures aromatiques polyhalogénés comprenant des atomes de chlore liés à un groupe biphényle (Figure 2). Un total de 1,3 million de tonnes de PCB comprenant 130 molécules individuelles a été fabriqué avant 1977 (Breivik *et al.*, 2002) pour une utilisation dans des applications industrielles, électriques ou autres.

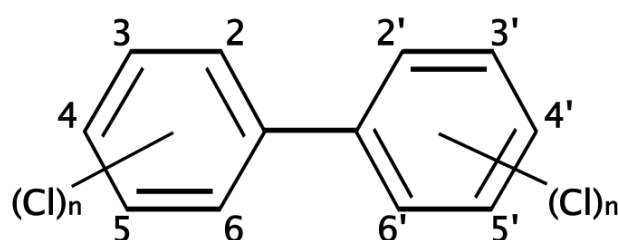


Figure 2 : Structure chimique des polychlorobiphényles.

Les positions possibles des atomes de chlore sur les noyaux benzéniques sont désignées par des numéros attribués aux atomes de carbone (Ptak and Lucja, 2013).

Actuellement, la production et la vente des PCB sont interdites aux États-Unis, mais leur stabilité thermodynamique élevée les rend résistants à la biodégradation. Par conséquent, les PCB continuent à être présents dans l'alimentation américaine, et l'apport quotidien est estimé à environ 30 ng / jour sur la base d'une étude récente réalisée à Dallas (Schechter *et al.*, 2010).

Cent pour cent des participants adultes de la NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey) avaient des niveaux détectables de PCB circulants en 2010, le PCB 153 (2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphényle) étant le composé dont la concentration sérique était la plus élevée (Cave *et al.*, 2010).

Une étude *in vivo* chez la souris mâle C57BL6/J a montré que le PCB 153 est un obésogène qui exacerbe la stéatose hépatique, modifie les adipocytokines et perturbe le métabolisme lipidique hépatique lorsqu'il est administré avec un régime riche en lipides (Wahlang *et al.*, 2013).

Une autre étude de Verhulst (Verhulst *et al.*, 2009) a montré que l'exposition prénatale aux PCBs et au dichlorodiphényldichloroéthylène (DDE) était associée à une augmentation de l'IMC dès l'enfance. Elle confirme une étude antérieure réalisée par Hertz-Picciotto (Hertz-Picciotto *et al.*, 2005) qui a révélé que l'exposition prénatale aux PCB était associée à une croissance accrue chez les garçons à l'âge de 5 ans. Les enfants ayant des niveaux d'hexachlorobenzène plus élevés dans le sang du cordon ombilical ont aussi un IMC plus élevé à l'âge de 6 ans que les enfants présentant des taux inférieurs (Smink *et al.*, 2008).

2.4.3. Le bnzo[a]pyrène comme exemple d'hydrocarbure aromatique polycyclique

Parmi les POP, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) constituent une sous-classe importante par le nombre de ses composants et par ses effets toxiques. Les HAP sont un groupe de composés organiques contenant deux ou plusieurs noyaux aromatiques (benzène) réunis dans une variété de différents arrangements (Figure 3). Ils sont lipophiles et peu solubles dans l'eau. De nombreux HAP sont connus pour être cancérigènes (Masih, 2012).

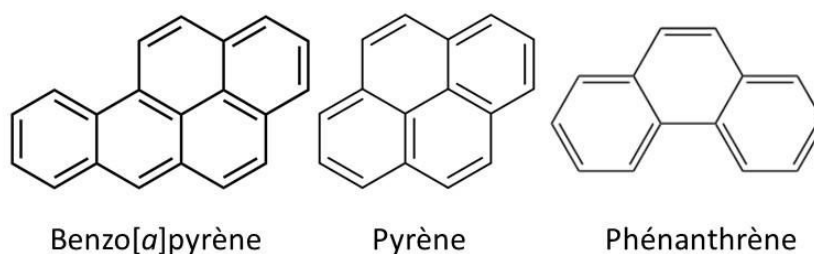


Figure 3 : Structure chimique de quelques HAP.

Le plus connu des HAP parmi les centaines de composés existants est le benzo[a]pyrène (B[a]P) (ATSDR, 1995). Comme les autres HAP, le B[a]P est produit principalement au cours

de combustions incomplètes, de bois, de charbon, de diesel, de graisse, de tabac ou d'encens (Boström *et al.*, 2002 ; Breivik *et al.*, 2002 ; Brevik *et al.*, 2012 ; Palanikumar *et al.*, 2012) puis rejeté dans l'atmosphère où il se présente essentiellement sous forme de particules, sa tension de vapeur étant extrêmement faible. Dans l'atmosphère, le B[a]P en phase vapeur dépasse rarement 10 % de la concentration totale. Il est présent dans les aliments en tant que contaminant résultant de l'accumulation de B[a]P dans la chaîne alimentaire et il est également produit par pyrolyse (Wang *et al.*, 2001). De nombreuses études constatent la présence de B[a]P dans les aliments avec une teneur qui est fonction de la préparation dudit aliment (Kazerouni *et al.*, 2001). L'huile de friture en est l'une des sources les plus importantes (Li *et al.*, 1994), ce qui place les systèmes de restauration rapide en « bonne position » pour la production de B[a]P alimentaire (Irigaray *et al.*, 2006). Le B[a]P a aussi été identifié dans la croûte carbonisée des biscuits et du pain, et dans les viandes grillées (jusqu'à 200 ppb), le poisson grillé et le café torréfié. Le hamburger grillé riche en matières grasses contient environ 43 ppb de B[a]P. Les steaks cuits au charbon de bois peuvent renfermer jusqu'à 50 ppb de B[a]P (Vries, 1996).

2.4.3.1. Métabolisme du B[a]P

Le B[a]P en tant que contaminant alimentaire peut être absorbé par voie orale (Ramesh *et al.*, 2001 ; Walle *et al.*, 2006), puis transporté par les chylomicrons et d'autres lipoprotéines (VLDL, *Low-density lipoprotein* ou LDL) *in vivo* (Vauhkonen *et al.*, 1980 ; Busbee *et al.*, 1990) et ainsi être distribué dans le foie, les reins et la vessie, le placenta (Kelman and Springer, 1982 ; Yamazaki *et al.*, 1987 ; Verma *et al.*, 2012). Il est métabolisé et activé dans le foie par les enzymes de la phase I et de la phase II (Ekström *et al.*, 1982 ; Mitchell *et al.*, 1987) en dérivés réactifs de type époxyde de dihydrodiol (par exemple le 7, 8 - dihydrodiol-9,10-époxyde ou BPDE). Ces métabolites se lient de façon covalente à l'ADN et forment des adduits BPDE (Boysen and Hecht, 2003). Ceci conduit à des mutations, à la croissance incontrôlée de cellules tumorales, et par conséquent, à la formation de tumeurs dans divers tissus (adénocarcinomes du poumon, tumeurs lymphoréticulaires, hépatomes, adénocarcinomes mammaires) (Irigaray *et al.*, 2006). En raison de sa nature lipophile, le B[a]P peut facilement pénétrer dans le cytoplasme par les membranes biologiques (Sureau *et al.*, 1990) et s'accumuler dans divers organes. La réduction du poids corporel lors d'un régime par exemple, entraîne une augmentation des concentrations plasmatiques des composés potentiellement toxiques qui peuvent affecter différentes cibles, comme le métabolisme des hormones thyroïdiennes (Pelletier *et al.*, 2002).

2.4.3.2. Absorption

Les HAPs peuvent être absorbés par les voies respiratoires, la peau et le tractus gastro-intestinal. Une absorption rapide du B[a]P a été rapportée suite à l'administration intra-gastrique à des rats, les niveaux les plus élevés ont été trouvés dans la lymphe thoracique 3 à 4 h après administration (Rees *et al.*, 1971). De façon générale, le B[a]P et les autres HAP sont facilement absorbés par le tractus gastro-intestinal lorsqu'ils se présentent sous forme de solutés dans différents lipides alimentaires. L'absorption est facilitée par la présence de sels biliaires dans la lumière intestinale. Chez le rat, 30-50 % de faibles doses orales de B[a]P ou de pyrène sont facilement absorbées et une proportion importante est rapidement métabolisée dans le foie (Foth *et al.*, 1988 ; Withey *et al.*, 1991). Le B[a]P et les autres HAP, tels que le phénanthrène et le pyrène, pénètrent rapidement la peau des souris et des rats. Chez la souris, 80 % du B[a]P a été retrouvé dans les fèces après 7 jours, et 46 % a été retrouvé dans les fèces et l'urine de rats après 5 jours, (Kao *et al.*, 1985 ; Yang *et al.*, 1986 ; Sanders *et al.*, 1986). L'absorption par la peau humaine a également été démontrée (Kao *et al.*, 1985).

2.4.3.3. Distribution

Indépendamment de la voie d'administration, les HAP sont rapidement distribués dans tout l'organisme. La répartition du B[a]P est similaire quel que soit le mode d'administration (sous-cutanée, intraveineuse et intratrachéale) chez les souris et les rats. Des taux détectables de B[a]P peuvent être observés dans la plupart des organes internes de quelques minutes à quelques heures après l'administration. Les taux les plus élevés sont retrouvés dans le foie (Foth *et al.*, 1988). Les tissus mammaires et les autres tissus adipeux constituent un lieu de stockage important pour les HAP (Modica *et al.*, 1983). Le B[a]P peut facilement traverser la barrière placentaire chez le rat et la souris (Neubert and Tapken, 1988 ; Withey *et al.*, 1993).

2.4.3.4. Activation

Le B[a]P est métaboliquement activé pour devenir un agent cancérigène suite à sa liaison à l'ADN et à l'induction du cytochrome P450 *via l'aryl hydrocarbon receptor* (AhR) (Schmidt and Bradfield, 1996 ; Fujisawa-Sehara *et al.*, 1988). La fixation du B[a]P à l'AhR induit la translocation du complexe AhR-B[a]P dans le noyau, où il interagit avec l'ARNT (*aryl hydrocarbon nuclear translocator*) pour former un hétérodimère AhR-ARNT qui se lie avec des AHREs (*AhR-responsive enhancer elements*) dans les promoteurs des gènes codant pour

plusieurs enzymes des phases I et II (Figure 4) (Hakura *et al.*, 1998 ; Denison *et al.*, 1988 ; Denison *et al.*, 1988b).

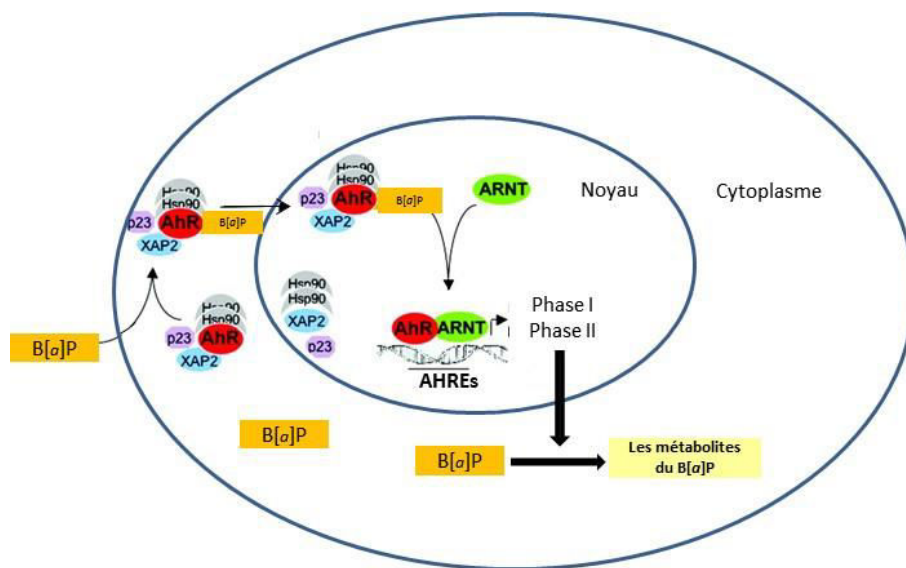


Figure 4 : Représentation schématique de la voie de signalisation AhR.

Le récepteur AhR cytosolique forme un complexe avec deux molécules de Hsp90 et une molécule de XAP2 (X-associated protein 2) et de p23. La liaison d'un ligand, par exemple le B[a]P, conduit à un changement de conformation, qui permet la translocation du complexe AhR. Dans le noyau, l'AhR se dissocie et se dimérise avec ARNT. Le dimère AhR-ARNT se lie alors à des AHREs (AhR-responsive enhancer elements) dans les promoteurs des gènes codant pour des enzymes des phases I et II

Le métabolisme du B[a]P est complexe, et génère un grand nombre de métabolites sous l'action des enzymes des phases I et II (Figure 5). La première étape d'activation comprend l'addition d'oxygène à la molécule mère, en présence de la cytochrome P-450 mono-oxygénase pour former des dérivés époxydes en position 2,3 -, 4,5 -, 7,8 -, et 9,10 (Sims and Grover, 1974). Sous l'action de l'époxyde hydrolase, ces époxydes subissent une hydratation pour conduire aux 4,5 -, 7,8 - et 9,10-trans-dihydrodiols. Parmi les composés formés, le B[a]P 7,8-trans-dihydrodiol a été répertorié comme cancérigène pour des cellules de rat et de souris (Huberman *et al.*, 1976 ; Levin *et al.*, 1977). Les époxydes peuvent aussi être convertis en intermédiaires phénoliques (1 -, 3 -, 6 -, 7 -, et 9-OH B[a]P isomères) par une réaction spontanée non enzymatique (Glatt and Oesch, 1976 ; Pelkonen and Nebert, 1982). Ces mêmes composés phénoliques peuvent également être formés par hydroxylation directe en position C-3 et C-6 (Gelboin, 1980). Sous l'action de peroxydases ou du cytochrome P450, le 6-OH B[a]P peut être oxydé en un cation radicalaire, le 6-oxy-B[a]P, qui est ensuite lui-même oxydé en 1,6 -, 3,6 - ou 6,12-quinones par l'intermédiaire de radicaux hydroquinone ou semiquinone (Sullivan, 1985 ; Cavalieri and Rogan, 1992).

Les quinones elles-mêmes ne sont pas mutagènes, mais les espèces réactives de l'oxygène générées par ces intermédiaires sont responsables des effets cytotoxiques (Wislocki *et al.*, 1976 ; Zhu *et al.*, 1995). Les phénols, les quinones, et les dihydrodiols sont conjugués à des glucuronides et à des esters de sulfate, ou sont spontanément hydrolysés en triols et tétrols (Yang *et al.*, 1977 ; Gelboin, 1980). En plus de la conjugaison, le 7,8-dihydrodiol B[a]P subit une oxydation en 7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde, un composé considéré comme le métabolite cancérogène ultime du métabolisme du B[a]P et connu pour former un adduit avec l'ADN en position de N2 de la guanine (Thakker *et al.*, 1977 ; Slaga *et al.*, 1979) (Figure 5).

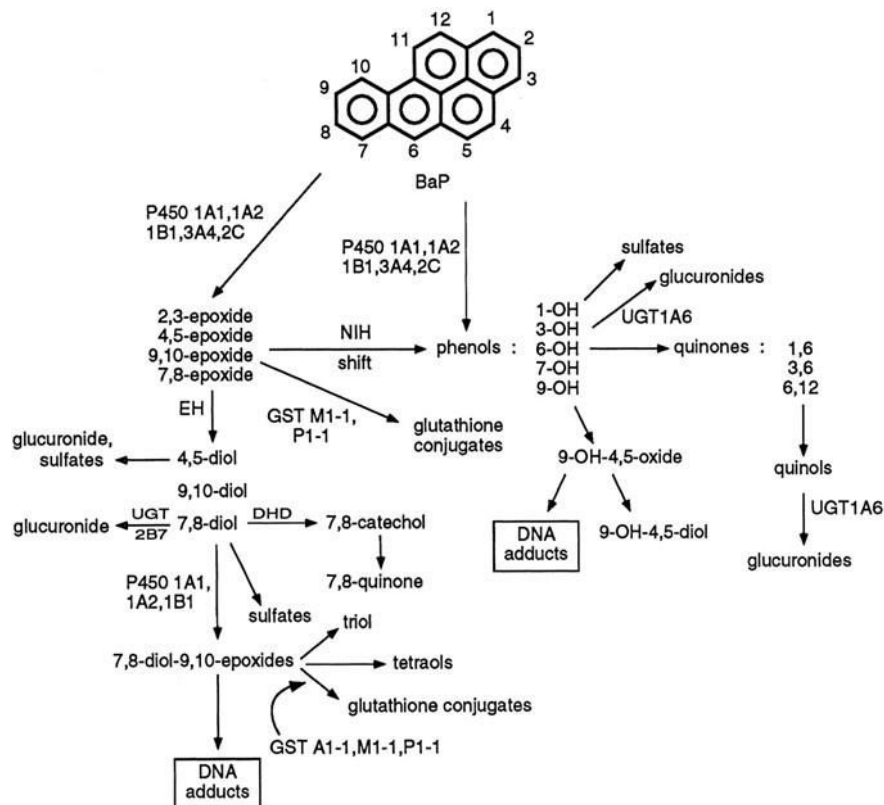


Figure 5 : Représentation de plusieurs étapes impliquées dans le métabolisme du B[a]P en métabolites réactifs sous l'action des enzymes de phase I et de phase II.

EH = époxide hydrolase; *DHD* = dihydrodiol dehydrogenase; *UGT* = UDP-glucuronosyl transferase; *GST* = glutathione S-transferase; *P450* = cytochrome P450; *NNAL* = 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol; 1-OH, 3-OH = 1-hydroxy B[a]P, 3-hydroxy B[a]P (Figure adaptée de Hecht, 1999).

2.4.3.5. Excrétion

L'excrétion hépatobiliaire et l'élimination par les fèces est la voie principale par laquelle le B[a]P est éliminé du corps, et ceci indépendamment de la voie d'administration (Foth *et al.*, 1988 ; van de Wiel *et al.*, 1993). L'urine est une autre voie d'excrétion, mais reste sur le plan quantitatif, moins importante que les précédentes.

2.4.3.6. Effets sur la santé

Comme nous l'avons décrit ci-dessus, la toxicité du B[a]P a été principalement attribuée à sa capacité à induire la formation d'adduits d'ADN (Kwack and Lee, 2000). Néanmoins, le B[a]P présente également des propriétés immunotoxiques qui affectent la fonction des macrophages (van Grevenynghe *et al.*, 2003) et augmentent la réponse inflammatoire locale, conduisant à une taille accrue des lésions d'athérosclérose. De plus, des études environnementales menées sur des sujets humains dans le début des années 1980 montrent une corrélation entre le taux plasmatique de B[a]P et l'IMC (Hutcheon *et al.*, 1983).

2.4.4. Autres exemples de HAP

2.4.4.1. Pyrène

Le pyrène est un autre membre de la famille des HAP, de formule brute $C_{16}H_{10}$, organisé en quatre noyaux benzéniques fusionnés. C'est un solide incolore qui est formé lors de la combustion incomplète des composés organiques. Il a été isolé pour la première fois à partir du goudron, où il est présent à hauteur de 2 %. Il est utilisé dans la fabrication de teintures, dans la synthèse de composés optiques utilisés pour leur brillance, et comme additif dans les huiles d'isolation électrique.

2.4.4.2. Phénanthrène

Le phénanthrène appartient également à la famille des HAP, sa formule brute est $C_{14}H_{10}$. Il est composé de trois anneaux de benzène. Le phénanthrène est essentiellement formé lors d'une mauvaise combustion de charbon, pétrole ou bois. Il est également associé à la formation de goudron. Des teneurs de $0,1 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-3}$ ont été retrouvées dans l'air et jusqu'à $10 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ dans l'eau de pluie ou les eaux de surface ; le sol et les sédiments en contiennent habituellement moins de $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (HSDB, 1999).

3. Dyslipidémies

3.1. Définition

Une dyslipidémie est une concentration anormalement élevée ou diminuée de lipides (cholestérol, triglycérides, phospholipides ou acides gras libres) dans le sang. Dans le sens

usuel, une dyslipidémie consiste en une augmentation du taux de ces éléments, une diminution étant un phénomène beaucoup plus rare qui ne nécessite pas de traitement particulier. La classification originale des dyslipidémies est basée sur le comportement des lipoprotéines en électrophorèse ou ultracentrifugation (Fredrickson and Lees, 1965). Conceptuellement, les dyslipidémies peuvent être classées en dyslipidémies primaires (causées par un défaut génétique ; Tableau 3) ou secondaires, quand elles se présentent comme une conséquence de régimes, de troubles métaboliques ou endocriniens, ou de la prise d'un traitement médical (Eaton, 2005 ; Alwaili *et al.*, 2009).

Tableau 3 : Dyslipidémies ayant une cause génétique
(adapté de Alwaili *et al.*, 2009)

Désordres	Gène	Effets sur LDL-C	Effets sur HDL-C	Effets sur TG
Lipoprotéines riches en TG				
• Déficience en lipoprotéine lipase	LPL		↓↓	↑↑↑
• Déficience de l'APOC2	APOC2		↓↓	↑↑↑
• Abetalipoprotéinémie	MTP	↓	↔	↓
Lipoprotéines de type remnants				
• Dysbetalipoprotéinémie III	APOE		↓	↑↑
• Déficience en lipase hépatique	HL			
Particules LDL				
• Hypercholestérolémie familiale	LDLR, PSK9	↑↑		
✓ Autosomale dominante				
✓ Autosomale récessive	ARH			
• Déficience familiale en apoB100	APOB	↑↑		
• Hypercholestérolémie				
• Hypobetalipoprotéinémie	APOB	↓		
• Sitostérolémie familiale	ABCG5/G8	↔		
• Lp(a) Hyperlipoprotéinémie familiale	APO(a)	↔		
Particules HDL				
• Déficit en ApoA1	APOA1		↓↓	
• Maladie de Tangier	ABCA1		↓↓	
• Déficit familial en LCAT	LCAT		↓↓	
• Déficit en CETP	CETP		↑	

Les troubles les plus communs associés à la dyslipidémie secondaire sont l'augmentation de la pression sanguine, l'intolérance au glucose et l'augmentation de la graisse abdominale ou obésité, qui correspondent à une combinaison d'anomalies métaboliques observées chez les patients atteints du syndrome métabolique (Grundy *et al.*, 2006 ; Grundy, 2007).

L'intestin et le foie sont les sources de TG du plasma. Ceux-ci sont principalement retrouvés dans le noyau des chylomicrons (CM) et des lipoprotéines de très basse densité (VLDL). En outre, de petites quantités de TG sont transportées dans des lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), dans des lipoprotéines de faible densité (LDL), ou dans lipoprotéines de haute densité (HDL). Le transport des TG dans ces lipoprotéines peut être diminué ou augmenté, en fonction de la taille des individus, de la composition alimentaire et de la dépense énergétique. Le foie joue un rôle central dans la capture des lipoprotéines riches en TG, des LDL et des HDL et de l'excédent d'énergie sous la forme d'acides gras libres du tissu adipeux, ou des hydrates de carbone et des protéines (Figure 6). Une augmentation du taux de TG peut être associée à des taux élevés de synthèse de VLDL, qui sont ensuite convertis en LDL, conduisant à une dyslipidémie associée à l'obésité et à un risque plus élevé de maladie cardiovasculaire.

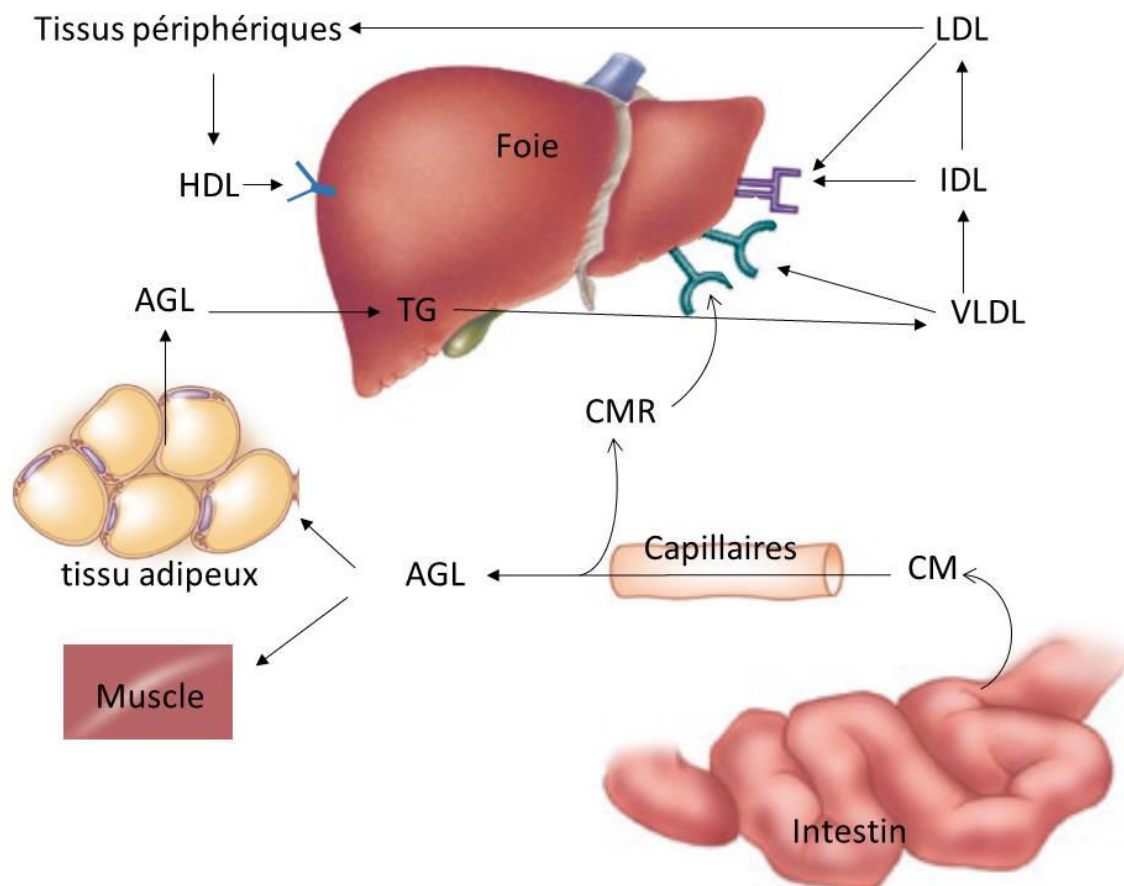


Figure 6 : Rôle du foie dans l'élimination et la distribution des lipoprotéines.

Le foie joue le rôle de « station centrale », grâce aux récepteurs pour la capture des lipoprotéines et leur distribution sous forme de lipoprotéines de différents tissus périphériques.

3.2. Les hyperlipidémies

Les hyperlipidémies (augmentation du taux de lipides sanguins) regroupent l'hypercholestérolémie, l'hypertriglycéridémie, l'hyperlipidémie mixte ou encore l'hyperchylomicronémie, selon le(s) type(s) de lipides dont le taux est élevé.

3.2.1. Hypertriglycéridémie

Les TG jouent un rôle essentiel en raison de l'apport énergétique qu'ils représentent et de leurs nombreuses fonctions biologiques. Cependant, des taux sanguins élevés de TG peuvent mener à des différentes maladies.

L'hypertriglycéridémie est définie comme une concentration anormale de TG dans le sang. Selon le *National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP III), un taux de triglycérides normal est inférieur ou égal à 150 mg / dL (Pejic and Lee, 2006).

Les deux principales sources de TG plasmatiques sont exogènes (TG provenant des graisses alimentaires et transportés par les chylomicrons) et endogènes (TG provenant du foie et transportés par les lipoprotéines VLDL (Yuan *et al.*, 2007).

L'hypertriglycéridémie post-prandiale élevée est un facteur de risque de maladies cardiovasculaires. Cette anomalie métabolique est principalement due à la surproduction et / ou à la diminution du catabolisme des lipoprotéines riches en TG (TRL). L'accumulation de TRL lors de la phase post-prandiale favorise la formation de petites lipoprotéines de faible densité, ainsi que le stress oxydatif, l'inflammation et la dysfonction endothéliale, qui engendrent des risques de maladies cardio-vasculaires (Chan *et al.*, 2013).

Une durée de vie prolongée des résidus de CM a pu être démontrée chez les patients hypertriglycéridémiques et une variété de défauts potentiels de la clairance des CM remnants (CMR) a été proposée. L'accumulation des CMR et des VLDL dans le plasma chez l'Homme est provoquée par :

- ✓ Un déficit ou l'absence d'ApoE nécessaire à la fixation aux récepteurs lipoprotéines.
- ✓ Une déficience en lipase hépatique : l'accumulation de petites particules VLDL enrichies en apoE a été décrite dans le plasma des patients atteints de ce trouble (Rubinstein *et al.*, 1985).

- ✓ La surproduction de particules VLDL serait également une cause l'augmentation relative des remnants (Cortner *et al.*, 1991).
- ✓ La surproduction de Apo C-III retarde la clairance des remnants par déplacement de l'apoE (de Silva *et al.*, 1994).

Chez l'animal, il a été démontré que le LSR contribuait d'une manière importante à la clairance des lipoprotéines riches en TG pendant la phase post-prandiale (Yen *et al.*, 2088), le LDL-R n'y contribuant que partiellement, et le LRP joue un rôle de back up, en l'absence de LDL-R (LDL-R *knock-out*).

3.2.2. Hypercholestérolémie

Le cholestérol est un composant lipidique essentiel des membranes cellulaires. Ce stérol régule la perméabilité, la fluidité et la rigidité des membranes, ainsi que l'activité de nombreuses protéines membranaires (Maxfield and Tabas, 2005). A côté de cette fonction structurale, le cholestérol est également la molécule précurseur de l'acide biliaire et de la synthèse des hormones stéroïdes. L'importance du cholestérol pour l'homéostasie cellulaire est illustrée par sa contribution au développement et au fonctionnement du système nerveux central (SNC) et des os (Porter, 2002), à la transduction du signal, au développement des spermatozoïdes et à la morphogenèse embryonnaire (Björkhem, 2002 ; Travis and Kopf, 2002).

Cependant, la présence de niveaux élevés de cholestérol dans le sang augmente par 3 le risque de mort par maladie cardiovasculaire (Stamler *et al.*, 2000), et constitue, avec l'athérosclérose, l'une des causes les plus fréquentes de décès dans le monde occidental (Ross, 1999 ; World Health Organization, 2003 ; Borissoff *et al.*, 2011).

L'hypercholestérolémie est généralement due à une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux. Les contributions génétiques sont généralement dues à des effets additifs de défauts de gènes multiples, et parfois au défaut d'un seul gène, comme dans le cas de l'absence du récepteur LDL-R pour l'hypercholestérolémie familiale. Un certain nombre de causes secondaires existent, notamment le diabète sucré de type 2, l'obésité, l'alcool, la gammopathie, la dialyse, le syndrome néphrotique, la jaunisse obstructive, l'hypothyroïdie, le syndrome de Cushing, l'anorexie mentale, les médicaments (diurétiques thiazidiques, la ciclosporine, les glucocorticoïdes, les *beta*-bloquants, l'acide rétinoïque) (Bhatnagar *et al.*, 2008).

L'ATP III (*National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III*) a reconnu que « l'épidémie d'obésité » aux États-Unis était en grande partie responsable de l'augmentation de la prévalence du syndrome métabolique et que l'obésité abdominale était particulièrement fortement associée au syndrome métabolique. L'association semble être liée à des facteurs libérés par le tissu adipeux : les acides gras non estérifiés (AGNE), les cytokines, le *Plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1), et l'adiponectine. Les cytokines libérées en excès induisent un état pro-inflammatoire. La production d'un excès de PAI-1 par les adipocytes contribue à un état pro-thrombotique. La résistance à l'insuline est un important facteur de risque sous-jacent secondaire du syndrome métabolique (Reaven, 1988), (Ferrannini *et al.*, 1991).

II. Le métabolisme des lipoprotéines

1. Lipoprotéines

Les lipoprotéines sont des complexes de protéines et de lipides, hydrosolubles, qui assurent le transport des lipides dans la circulation des vertébrés (Glaumann *et al.*, 1975) et des insectes (Rodenburg and Van der Horst, 2005). Elles sont formées au niveau du foie (Eaton and Kipnis, 1969 ; Koga *et al.*, 1969) et de l'intestin (Wasan and Cassidy, 1998), et sont captées par le foie et les tissus périphériques par endocytose grâce à des récepteurs.

L'assemblage, la structure, le métabolisme et l'interaction lipoprotéines/récepteur sont déterminés par leurs composants en apolipoprotéines, mais les classifications les plus courantes des lipoprotéines sont basées sur leur mobilité électrophorétique (Stocks and Miller, 1999) ou leur densité (Gofman *et al.*, 1949) (Figure 7). Ces classifications distinguent les CM, les VLDL, les LDL et les HDL. Les CM renferment seulement 1-2% de protéines (Scanu and Page, 1959), alors que les protéines représentent environ 50 % du poids des HDL. (Scanu, 1966). Le diamètre des lipoprotéines est inversement corrélé à leur densité et la gamme de taille est d'environ 6000 Å de diamètre pour les CM à 70 Å pour les plus petites HDL (Scanu, 1966).

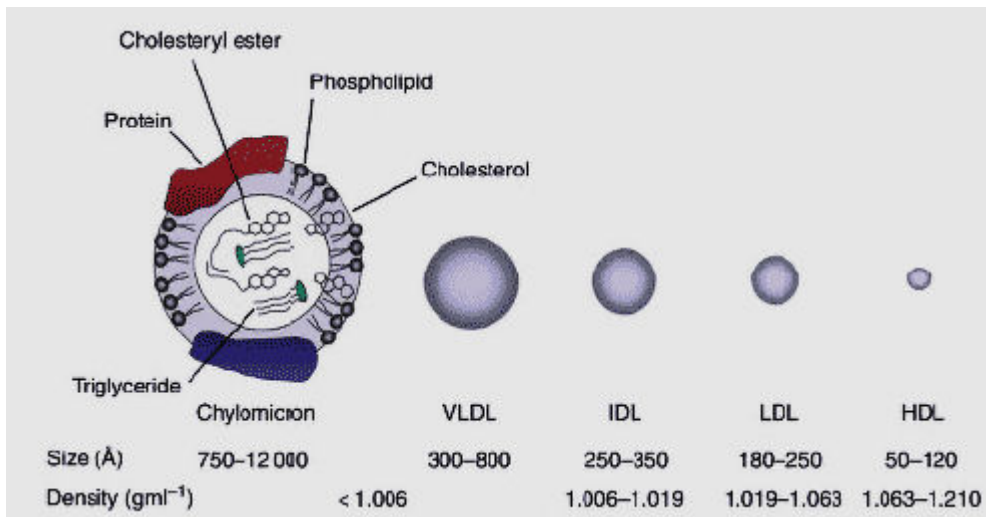


Figure 7 : Classification des lipoprotéines.

(d'après Thorngate & Williams, http://www.morphology.dp.ua/_dict/?wid=770)

L'organisation structurelle générale est la même pour toutes les classes de lipoprotéines : les apolipoprotéines (apo) et les lipides amphipathiques -principalement des phospholipides (PL) et du cholestérol libre (CL)- forment la coque externe (Scanu, 1966). La structure amphiphile des PL permet une solubilité adéquate des lipoprotéines : la tête hydrophile est en contact avec le plasma alors que le pôle opposé, hydrophobe, interagit avec le noyau lipidique contenant des triglycérides, des esters de cholestérol (CE) et de petites quantités d'autres substances hydrophobes, comme des vitamines liposolubles (Shepherd, 1994 ; Toussaint *et al.*, 2003) (Figure 8).

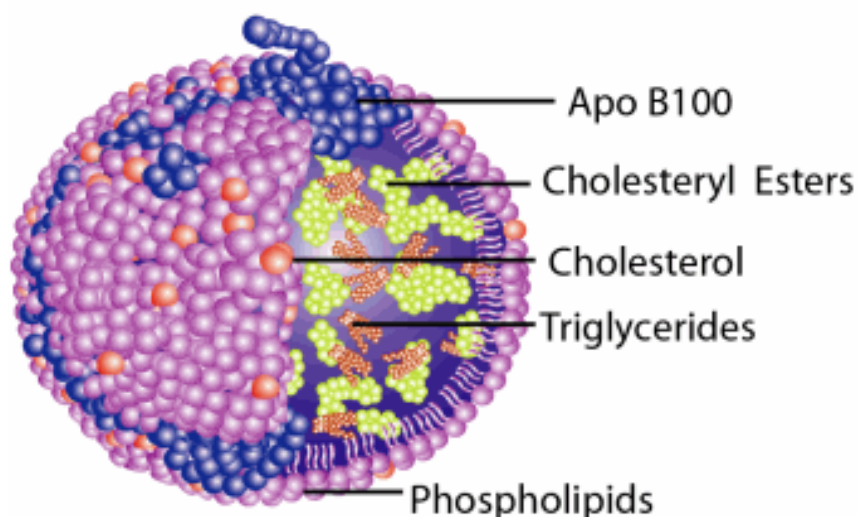


Figure 8 : Structure des lipoprotéines.

(http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/19060/LDL_and_LDL_receptor.gif)

Bien que les concentrations de lipoprotéines dans le plasma sanguin soient très variables, selon l'âge, le sexe, l'alimentation et l'état (métabolique, hormonal ou pathologique) des individus, des concentrations représentatives des lipoprotéines (en poids total) pour un homme adulte, sain, à jeun, dans le plasma sont d'environ 0 mg/dL pour les CM, 150 mg/dL pour les VLDL, 410 mg/dL pour le LDL-cholestérol, et 280 mg/dL pour le HDL-cholestérol.

1.1. Composants des lipoprotéines

1.1.1. Composition lipidique globale

La teneur et la composition lipidique des lipoprotéines (Tableau 4) montrent une corrélation négative entre la teneur totale en lipides et la densité des lipoprotéines. Les glycérolipides, principalement des TG sont les principaux constituants lipidiques des CM et des VLDL, mais représentent moins de 11% des lipides des LDL et HDL, qui sont enrichis en CE (24-51%). Le cholestérol libre se retrouve dans toutes les classes de lipoprotéines dans des proportions relativement faibles, car il est activement estérifié par la lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT) dans les HDL et ensuite redistribué aux LDL et VLDL par la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP). Le taux total de PL des lipoprotéines augmente avec leur densité.

Les principaux PL sont les phosphatidylcholines (PC ; 57-81% du poids total de PL), suivies par les sphingomyélines (12-26% du poids total de PL). La Lyso-PC et d'autres PL (phosphatidyléthanolamine, phosphatidylsérine et phosphatidylinositol) représentent 5-15% du poids des PL. Les glycolipides sont présents seulement à l'état de traces et les acides gras libres représentent moins de 3% de la masse totale de lipides (Tableau 4).

- **Composition en acides gras**

A jeun, la composition en acides gras des lipoprotéines reflète leur origine biosynthétique et les transformations métaboliques lors de la circulation **Tableau 5**.

Les glycérolipides (principalement des TG) renferment de fortes proportions en acides gras 18:1 et 16:0, ce qui reflète leur synthèse dans le foie. La majeure partie des CE dans les lipoprotéines humaines est formée dans la circulation par l'action de la LCAT. Cette enzyme agit sur la PC des HDL et sur le cholestérol non estérifié pour former la lysoPC et les CE. Durant la phase postprandiale, lorsque les concentrations en CM de la lymphe et du plasma sont maximales, la composition en acides gras des CM reflète la composition en acides gras du repas **Tableau 5**.

Tableau 4 : Propriétés physiques et compositions lipidiques des classes de lipoprotéines.
(d'après <http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/lipoprot/index.htm>)

	CM	VLDL	LDL	HDL
Densité (g/mL)	<0.94	0.94-1.006	1.006-1.063	1.063-1.210
Lipides totaux (% poids total)	98-99	90-92	75-80	40-48
Glycérolipides (% du poids total de lipides)	81-89	50-58	7-11	6-7
Esters de cholestérol (% du poids total de lipides)	2-4	15-23	47-51	24-45
Cholestérol non-estérifié	1-3	4-9	10-12	6-8
Phospholipides (PL) (% du poids total de lipides)	7-9	19-21	28-30	42-51
Phosphatidylcholine (PC) (% du poids total de PL)	57-80	60-74	64-69	70-81
Sphingomyéline (SM) (% du poids total de PL)	12-26	15-23	25-26	12-14
Lysophosphatidylcholine (en % du poids total de PL)	4-10	5	3-4	3
Autre (en % du poids total de PL)	6-7	6-10	2-10	5-10

Tableau 5 : Composition en acides gras.
(% en poids du total) dans les principaux lipides de classes de lipoprotéines humaines
(<http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/lipoprot/index.htm>)

Acide gras	VLDL	LDL	HDL
Glycérolipides			
16:0	26.9	23.1	23.4
18:0	2.9	3.3	3.5
18:1	45.4	46.6	43.8
18:2	15.7	15.7	15.9
20:4	2.5	5.4	7.6
Esters de cholestérol			
16:0	11.5	11.3	11.4
18:0	1.4	1	1.1
18:1	25.6	22.4	22.4
18:2	51.8	59.9	54.8
20:4	6.1	6.9	6.3
Phospholipides			
16:0	33.8	36	31.8
18:0	14.7	14.3	14.5
18:1	12.2	11.6	12.3
18:2	20.3	18.9	20.6
20:4	13.6	13.2	15.7

- **Organisation des lipides**

Les propriétés dynamiques des monocouches lipidiques des lipoprotéines dépendent fortement de la nature des lipides qui les constituent. Par exemple, les lipides de surface des LDL sont plus condensés et rigides que ceux des HDL, en raison d'un contenu plus important en acides gras saturés dans les PL des HDL, d'un rapport sphingomyéline / PC plus élevé ainsi que d'un rapport cholestérol non estérifié / PL plus élevé. La monocouche de surface des VLDL est encore plus fluide que celle des HDL, en raison de différences de composition des lipides de la monocouche. Les apolipoprotéines exercent peu ou pas d'effet sur l'assemblage moléculaire moyen des lipides de surface, en particulier dans les LDL et VLDL. Ainsi, les lipides de surface, reconstitués en vésicules ou microémulsions, ont une fluidité, une vitesse de diffusion et une mobilité comparable à celles qu'ils possèdent au sein de la lipoprotéine. Les lipides retrouvés dans le noyau (TG et CE) ne représentent qu'environ 3 et 1 %, respectivement, des lipides de surface (Miller and Small, 1983).

1.1.2. Apolipoprotéines

- **Classes et propriétés générales**

Les apolipoprotéines retrouvées dans le plasma (Tableau 6) sont de deux types : les apolipoprotéines non-échangeables et les apolipoprotéines échangeables ou solubles. L'apo B100 et l'apoB48, composants protéiques principaux des LDL et des VLDL, de la lipoprotéine (a) (Lp (a)), et des CM sont des apolipoprotéines non-échangeables. Ce sont des protéines de très grande taille et insolubles dans l'eau, qui sont assemblées avec des lipides sur leur lieu de synthèse dans le réticulum endoplasmique des cellules du foie ou des intestins (Segrest *et al.*, 1992). Ces apolipoprotéines non échangeables circulent liées à la même particule de lipoprotéine lors des diverses transformations métaboliques dans le plasma, jusqu'à leur clairance en tant que lipoprotéines, *via* des récepteurs spécifiques (Segrest *et al.*, 1992). En revanche, les apolipoprotéines échangeables (par exemple, apoA1, apoA2, apoC, apoE) ont des masses moléculaires beaucoup plus petites que les apolipoprotéines apo B100 ou apo B48 et une solubilité limitée dans l'eau à l'état délipidé. Elles peuvent être transférées d'une particule de lipoprotéine à l'autre et peuvent acquérir des lipides dans la circulation (Segrest *et al.*, 1974). La fonction commune de toutes les apolipoprotéines est d'aider à solubiliser les lipides neutres dans la circulation (Tableau 6).

Tableau 6 : Identité, expression tissulaire, distribution plasmatique et fonction des principales apolipoprotéines humaines.
(d'après Hanse, 2011)

Nom	Tissu	Distribution	Fonction
apoAI	foie, intestin	CM, HDL	Structurale ; activateur physiologique de la LCAT ; efflux de cholestérol
apoAII	foie (intestin)	HDL	Structurale ; activateur/inhibiteur de la HL ; efflux de cholestérol
apoAIV	foie, intestin	CM, HDL	Transport inverse du cholestérol ; activateur de la LCAT ; métabolisme des lipoprotéines riches en TG
apoAV	foie		Métabolisme des lipoprotéines riches en TG
apoB100	foie	VLDL, IDL, LDL	Structurale : synthèse et sécrétion des VLDL ; ligand du récepteur LDL-R
apoB48	intestin	CM	Structurale ; synthèse et sécrétion des CM
apoCI	foie (intestin)	CM, VLDL, HDL	Inhibiteur physiologique de la CETP ; activateur de la LCAT ; inhibiteur de la liaison aux LDL-R, LRP et VLDL-R
apoCII	foie (intestin)	CM, VLDL, HDL	Activateur physiologique de la LPL
apoCIII	foie (intestin)	CM, VLDL, HDL	Inhibiteur physiologique de la CETP ; inhibiteur de la capture hépatique de lipoprotéines riches en TG
apoD (apo AIII)	foie, intestin, rate, pancréas, cerveau, surrénales, reins	HDL, LDL, VLDL	Transport inverse du cholestérol (?)
apoE	foie, macrophage, cerveau	CM, VLDL, IDL, HDL	Ligand des récepteurs LDL-R et LRP
apoF	foie	LDL (VLDL, HDL)	Inhibiteur de la CETP
apoG		HDL	?
apoH (b2 glycoprotéine I)		HDL	?
apoJ (clusterine)		HDL	Anti-inflammatoire
apo L		HDL	?
apo SAA		HDL, CM	Phase aiguë de l'inflammation

Certaines apolipoprotéines sont connues pour activer ou inhiber des enzymes plasmatiques. Ainsi, l'apoA1 et dans une moindre mesure, l'apoE, l'apoA4, et l'apoC1 (Steinmetz *et al.*, 1985 ; Getz and Reardon, 2009), activent la LCAT ; l'apoC2 et peut-être l'apoA5 activent la lipoprotéine lipase (Jong *et al.*, 1999), et l'apoC3 et l'apoA2 peuvent agir comme des inhibiteurs de la lipase hépatique (Weng *et al.*, 1999 ; Mendivil *et al.*, 2010).

Les apolipoprotéines ont également un rôle dans la reconnaissance des récepteurs. L'interaction la mieux caractérisée est la reconnaissance du récepteur LDL par les lipoprotéines riches en apoB100 et apoE. Mais d'autres interactions apolipoprotéines / récepteur ont été décrites, comme par exemple celle du récepteur SR-BI qui fixe les HDL, en reconnaissant différentes apolipoprotéines, y compris l'apoA1, l'apoA2, l'apoB100 et l'apoE (Williams *et al.*, 2000 ; Bultel-Brienne *et al.*, 2002 ; de Beer *et al.*, 2004).

1.2. Les différentes classes de lipoprotéines

Comme indiqué précédemment, les classifications les plus courantes des lipoprotéines sont basées sur leur densité (Gofman *et al.*, 1949) ou sur leur mobilité électrophorétique en gel d'agarose (Stocks and Miller, 1999). Ces propriétés sont liées à la teneur relative de protéines et de lipides qui déterminent la densité de ces lipoprotéines.

1.2.1. Very low-density lipoprotein

Les VLDL sont des molécules de densité très faible, inférieure à 1,006 dont le diamètre est compris entre 30 et 80 nm. Elles sont formées au niveau du foie et composées de TG, et des apolipoprotéines apoB et apoE (Eaton and Kipnis, 1969 ; Koga *et al.*, 1969). Elles constituent un moyen de transport des lipides endogènes (TG, PL, cholestérol et CE), alors que des CM assurent le transport des lipides exogènes (lipides d'origine alimentaire). Les VLDL naissantes interagissent avec les molécules de HDL, qui leur apportent du cholestérol, des PL, de l'apoCII et de l'apoCIII, pour générer des VLDL matures. Leur analyse électrophorétique en gel d'agarose révèle un profil dit « de type pré β » par comparaison avec le profil de migration des globulines sériques. Les particules VLDL sont converties en LDL dans la circulation sanguine suite à l'hydrolyse des TG dans leur noyau par la *lipoprotein lipase*.

1.2.2. Intermediate Density Lipoproteins

Les *Intermediate Density Lipoproteins* (IDL) sont des molécules de densité comprise entre 1,006 et 1,019 et dont le diamètre est compris entre 25 et 35 nm (Chen and Kane, 1979). Les IDL transportent principalement des CE, des TG et sont composées d'apoB100, d'apoE, d'apoCII et d'apoCIII. Comme les VLDL, les IDL sont des molécules présentant une mobilité électrophorétique de type pré β . Les IDL sont ensuite dégradées par la lipase hépatique (HL) pour générer des LDL (Vaubourdolle, 2007).

1.2.3. Low-density lipoprotein

La densité des LDL varie de 1,019 à 1,063 (Shen *et al.*, 1981), suite à l'hydrolyse des TG des VLDL et IDL, le cœur hydrophobe des LDL étant principalement formé de CE destinés aux tissus périphériques. La coque externe contient l'apoB100. Ces molécules ont une mobilité électrophorétique de type β .

1.2.4. High density lipoprotein

Les molécules de HDL sont les lipoprotéines les plus denses (densité : 1,063 à 1,210) car elles contiennent la plus forte proportion de protéines. Ce sont aussi les plus petites des particules de lipoprotéines avec un diamètre compris entre 5 et 12 nm (Scanu, 1966). Elles sont riches en CE et en PL, et contiennent les apolipoprotéines apoA-I, l'apoA-II, l'apoC-II et C-III et apoE.

1.2.5. Les chylomicrons

Les CM ($d < 1,006$) sont des particules de lipoprotéines hétérogènes synthétisées exclusivement pendant l'état postprandial par les cellules épithéliales des villosités du duodénum, pour transporter les lipides exogènes et les vitamines liposolubles de l'intestin vers les tissus périphériques appropriés (foie, tissu adipeux, cardiaque, et tissu musculaire squelettique) pour le stockage ou le métabolisme (Yu and Cooper, 2001).

2. Le transport des lipoprotéines

2.1. Le transport exogène

La formation des CM dans l'intestin et leur sécrétion dans la lymphe intestinale ont été découverts par les travaux pionniers de Gage & Fish en 1924 (Brewster *et al.*, 1978).

L'assemblage intestinal des CM est essentiel pour l'absorption des lipides alimentaires, des vitamines liposolubles et pour leur distribution aux tissus périphériques (Ginsberg *et al.*, 2006).

2.1.1. Assemblage et sécrétion des chylomicrons

L'activité de la lipase pancréatique sur les positions sn-1 et sn-3 de la molécule de TG résulte en la libération du 2-monoacylglycérol (2-MAG) et d'acides gras libres (AGL) (Mattson and Beck, 1956 ; Mattson and Volpenhein, 1968). De plus, l'hydrolyse des 1- ou 2-MAG par la lipase pancréatique résulte en la formation de glycérol et d'AGL (Hofmann and Borgstrom, 1963). Les produits d'hydrolyse des lipides sont solubilisés dans les micelles et présentés aux membranes apicales des entérocytes (Phan and Tso, 2001 ; Mu and Høy, 2004). Les entérocytes intestinaux absorbent rapidement et efficacement les AG libérés par l'émulsification et l'hydrolyse des lipides alimentaires, et synthétisent des TG pour former une population hétérogène de lipoprotéines appelées CM (Tso and Balint, 1986). La membrane apicale renferme plusieurs protéines de transport qui participent à l'absorption des différents types de lipides. Par exemple, Niemann-Pick C1 like 1 (NPC1L1) est une protéine impliquée dans l'absorption du cholestérol (Altmann *et al.*, 2004), le récepteur CD36 et la protéine de transport des acides gras (FATP) participent au transport des AG (Schaffer and Lodish, 1994 ; Drover *et al.*, 2005 ; Abumrad, 2005 ; Bonen *et al.*, 2007) alors que le récepteur scavenger de classe B type I (SR-BI) est impliqué dans l'absorption de la vitamine E (Reboul *et al.*, 2006). Les acides gras libres et les monoacylglycérides (MAG) traversent la membrane des entérocytes et sont transportés du cytosol vers le réticulum endoplasmique (RE) par des *fatty acid binding proteins* (FABP) (Agellon *et al.*, 2002). Les TG sont resynthétisés par l'acyl-CoA: monoacylglycerol acyltransferase (MGAT) et l'acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase (DGAT) (Black, 2007). L'acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) est également présente dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) où elle facilite l'estérification du cholestérol (MacDonald and Ong, 1988 ; Buhman *et al.*, 2000).

L'apoB48 est un composant essentiel des lipoprotéines libérées par l'intestin. L'apoB48 est le résultat d'une modification post-transcriptionnelle de l'ARNm de l'apoB qui s'effectue dans l'intestin des mammifères et qui est appelée « editing » de l'apo B. De ce fait, l'apoB48 ne renferme que 48% de la séquence de l'apoB100 (côté N-terminal). Elle permet la synthèse des CM par les entérocytes alors que la synthèse d'apoB100 entraîne la synthèse et la sécrétion des VLDL par le foie (Yoshimura *et al.*, 2009). L'apoB48, plus courte et moins rigide que l'apoB100, ne possède pas le domaine de liaison au récepteur de l'apoB reconnu par le LDL-

R. Cependant, les CM qui renferment l'apoB48 et sont riches en apoE, sont reconnus par les récepteurs LRP (après ajout d'apoE exogène), LSR et LDL-R hépatiques, qui internalisent les résidus de CM par liaison avec l'apoE, les VLDL par reconnaissance de l'apoE ou l'apoB100 et les LDL par reconnaissance de l'apoB100 (Véniant et al., 1998 ; Yen *et al.*, 1994 ; Bihain and Yen, 1992). Un autre facteur requis pour l'assemblage des lipoprotéines intestinales est la *microsomal triglyceride transferase* (MTP) (Black, 2007 ; Mansbach and Gorelick, 2007). Un CM primordial contenant de l'apoB48 et des TG est enrichi en TG et CE par la MTP pour former un pré-CM (Black, 2007). L'interaction de l'apoB avec des lipides résulte en la libération de lipoprotéines naissantes dans le lumen du RE (van Greevenbroek and de Bruin, 1998). L'apoA-IV est ajouté à la surface des CM (Carrière *et al.*, 2005). Après maturation finale dans le Golgi, le CM mature est sécrété par la membrane basolatérale par exocytose dans la voie lymphatique (Siddiqi *et al.*, 2003 ; Black, 2007) (Figure 9).

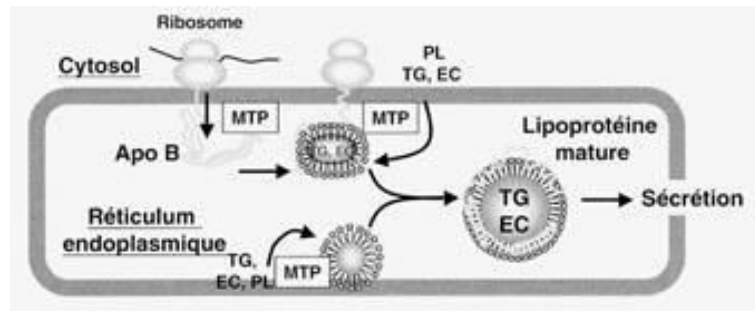


Figure 9 : Assemblage intracellulaire des lipoprotéines riches en triglycérides, chylomicrons et VLDL.

(d'après Toussaint et al., 2003)

2.1.2. Distribution des chylomicrons

Après leur libération dans la circulation générale, les HDL matures, riches en CE, cèdent l'apoE et l'apoC-II aux CM naissants (Kaysen, 2007). Ce processus est essentiel pour le métabolisme des CM parce que l'apoE est un facteur déterminant pour la fixation des CMR aux membranes hépatiques et leur élimination par endocytose par les récepteurs hépatiques (Sherrill *et al.*, 1980 ; Shelburne *et al.*, 1980 ; Cooper *et al.*, 1982). L'ApoC-II sert d'activateur pour la lipoprotéine lipase (LaRosa *et al.*, 1970 ; Havel *et al.*, 1973). La lipoprotéine lipase, liée à surface luminale des cellules endothéliales des capillaires qui perfusent le muscle squelettique, le tissu adipeux et le myocarde, catalyse l'hydrolyse des TG des CM et des VLDL. Cela conduit à la libération de plus de 70% des AG et à leur absorption par les myocytes et par les adipocytes. Dans le tissu adipeux, les AGL sont mis en réserve après leur estérification, ce qui permet la

synthèse de nouveaux TG (Merkel *et al.*, 2002). En conséquence, de nouvelles particules de plus petites tailles et riches en CE sont produites, les CMR, qui sont ensuite libérés dans la circulation où ils cèdent l'apoC aux HDL pauvres en esters de cholestérol. Ces particules sont rapidement éliminées du sang essentiellement par le foie (Yu and Cooper, 2001). Les CM, dont la demi-vie est de l'ordre de 10 minutes, sont donc rapidement épurés de 90 % de leurs TG. Parallèlement à l'hydrolyse des TG, les CM perdent d'autres constituants puisque 80 % des PL et 40 % des apoprotéines, principalement apoAI, apoAII et apoC, sont transférés aux HDL durant leur catabolisme (Redgrave and Small, 1979). Les CM et leurs remnants sont également riches en apoE. Cet enrichissement résulte de l'acquisition de l'apoE dans l'espace extracellulaire après sécrétion de la lipoprotéine à partir des cellules épithéliales de l'intestin dans la lymphe.

Le métabolisme des CM et leurs remnants est une voie permettant de distribuer l'énergie provenant de l'alimentation pour le stockage dans les tissus adipeux ou une utilisation immédiate dans les muscles (Karpe, 1999).

2.1.3. Capture des résidus de chylomicrons

Les CM subissent la lipolyse dans la circulation catalysée par la lipoprotéine lipase et puis entrent dans l'espace de Disse, entre l'endothélium et l'hépatocyte.

L'hépatocyte représente le site d'élimination des résidus de CM. Un nouveau récepteur hépatique aux lipoprotéines, LSR, a été découvert et identifié comme ligand des lipoprotéines apoB et apoE, qui présente une forte affinité pour les lipoprotéines riches en TG telles que les CM. Ce récepteur est actif en présence des AGL produits lors de la lipolyse et est impliqué dans la clairance des résidus de CM (Yen *et al.*, 2008). Une fois internalisés, les résidus de CM peuvent fusionner avec des lysosomes qui induisent une lipolyse et une protéolyse quasi complète de ses constituants.

En effet, les CE et les TG sont hydrolysés au niveau des lysosomes (Lusa and Somerharju, 1998), puis le cholestérol libre est ensuite ré-estérifié par l'ACAT et stocké sous forme de gouttelettes de CE (Redgrave, 1970 ; Stone *et al.*, 1989), les AGL sont oxydés et rentrent dans le système de synthèse des TG. Le cholestérol et les TG sont alors soit intégrés dans de nouvelles particules synthétisées par le foie (VLDL) ayant pour but d'approvisionner les tissus

périphériques (transport endogène) soit excrétés dans les canicules biliaires en vue de leur élimination (Figure 10).

2.2. Le transport endogène

La voie endogène du métabolisme des lipoprotéines réfère à la sécrétion hépatique et au métabolisme des VLDL en IDL et LDL (Gibbons, 1990). Seuls deux types de lipoprotéines, les VLDL et les CM, sont entièrement formés dans les cellules par l'assemblage dans le RE. Les VLDL sont formées dans l'appareil de Golgi et sécrétées dans le sang par le foie (Gibbons, 1990). Elles contiennent 4 à 5 molécules de TG pour une molécule de CE (André-Fouët *et al.*, 2004). Les particules VLDL comme les CM contiennent les apoC et apoE mais renferment de l'apoB-100 au lieu de l'apoB-48. Elles ont un rapport cholestérol / TG plus élevé. Elles peuvent enrichir leur contenu en CE par un transfert provenant des HDL médié par la CETP. L'assemblage de TG hépatiques avec les autres composants majeurs de la particule VLDL naissante (apoB-100, CE, PL et vitamine E) nécessite l'action de la protéine de transfert des microsomes (MTP). Les particules assemblées se déplacent à la surface de la cellule et sont libérés par exocytose. Une fois en circulation, les VLDL viennent en contact avec la lipoprotéine lipase des tissus adipeux musculaire, cardiaque et squelettique. Les TG des VLDL sont hydrolysés par la LPL, en particulier dans le tissu adipeux et le tissu musculaire. L'enzyme activée facilite l'hydrolyse des TG des VLDL, ce qui provoque la libération d'AG et de glycérol à partir d'une partie des TG. Les AG libérés pénètrent dans les cellules par les transporteurs tels que FATP et CD36. L'apoC-II est transférée des VLDL aux HDL, mais les VLDL conservent l'apoE. Les HDL transfèrent également les CE aux VLDL en échange de PL et de TG par la *cholesteryl ester transfer protein* (CETP). Comme les VLDL subissent une hydrolyse supplémentaire par LPL et l'action de la CETP, ils continuent à diminuer en taille et deviennent des IDL. Le foie élimine 40 à 60% des VLDL et des IDL par endocytose *via* les récepteurs de lipoprotéines qui reconnaissent l'apoE (Véniant *et al.*, 1998). Le reste des IDL est remodelé par la lipase hépatique (HL) pour former les LDL; au cours de ce processus, la plupart des TG dans la particule sont hydrolysés et toutes les apolipoprotéines, sauf l'apoB-100, sont transférées sur d'autres lipoprotéines. La Lipoprotéine (a) [Lp (a)] ressemble aux LDL par sa composition lipidique et hépatique, mais elle contient une protéine supplémentaire appelée apolipoprotéine (a) [apo (a)]. L'apo(a) est synthétisée dans le foie et est liée à l'apoB-100 par un pont disulfure (Figure 10).

2.3. Le transport inverse

Cette voie de transfert assure le retour du cholestérol excédentaire des tissus périphériques incapables de le stocker vers le foie. Le foie est le seul organe capable d'éliminer le cholestérol excédentaire de l'organisme par la voie biliaire, le cholestérol pouvant être excrété sous forme native ou sous forme d'acides biliaires (Li *et al.*, 2011). Les mouvements de cholestérol peuvent se faire par diffusion à travers la membrane plasmique puis par incorporation dans les HDL (Figure 10), mais peuvent être favorisés par le récepteur SR-B1 ainsi que par la protéine *ATP-binding cassette transporter* (ABCA1) codée par le gène ABCA1 (Hovingh *et al.*, 2003 ; Peng *et al.*, 2004).

Ce processus de transport inverse du cholestérol commence par la synthèse de l'apoA-I dans le foie et sa libération dans la circulation. Ce sont les HDL natives qui se chargent du transport du cholestérol cellulaire. Les HDL natives sont pauvres en lipides et ont une forme discoïdale du fait de l'absence de lipides neutres dans leur cœur. Elles ont une mobilité électrophorétique de type pré β (pré β -HDL) qui les distingue des molécules de HDL (mobilité de type α) retrouvées principalement dans les compartiments intravasculaires. Au contact des cellules périphériques, ces petites HDL captent le cholestérol libre membranaire. Cette réaction est facilitée par le récepteur ABCA1. L'enrichissement progressif en cholestérol libre génère des HDL de taille croissante (pré- β 2, puis des pré- β 3 HDL). Ces HDL acquièrent, dans le plasma, de la lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT) qui catalyse l'estérification du cholestérol libre. Les CE ainsi formés intègrent le cœur des HDL qui adoptent une forme sphérique (HDL3). Ces particules se chargent en apolipoprotéines échangeables, telles que les ApoE et C. Elles échangent des CE contre des TG aux VLDL grâce à l'action de la CETP. A ce stade, elles deviennent des HDL2 captées par le foie *via* l'ApoE. L'acquisition des PL et des apolipoprotéines, qui sont libérées dans la circulation suite à la lipolyse des TG à partir des CM et des VLDL par l'action de la LPL, convertit les HDL3 en de plus grandes particules, les HDL2 (Yokoyama, 1998 ; Brewer, 2004), (Figure 10). Récemment, ABCG1 a été identifié comme un nouveau transporteur ABC de 75,6 kDa exprimé entre autres dans les macrophages et les hépatocytes, qui permet l'efflux du cholestérol cellulaire aux particules HDL *in vitro* (Klucken *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004; Kennedy *et al.*, 2005) et contribue au transport inverse de cholestérol *in vivo* (Zhang *et al.*, 2005). L'expression d'ABCG1 dans le foie est augmentée de façon significative en réponse à l'activation par LXR (Kennedy *et al.*, 2005). Les souris

knocked-out pour ABCG1 nourries avec un régime athérogène montrent une athérogenèse accélérée (Out *et al.*, 2007).

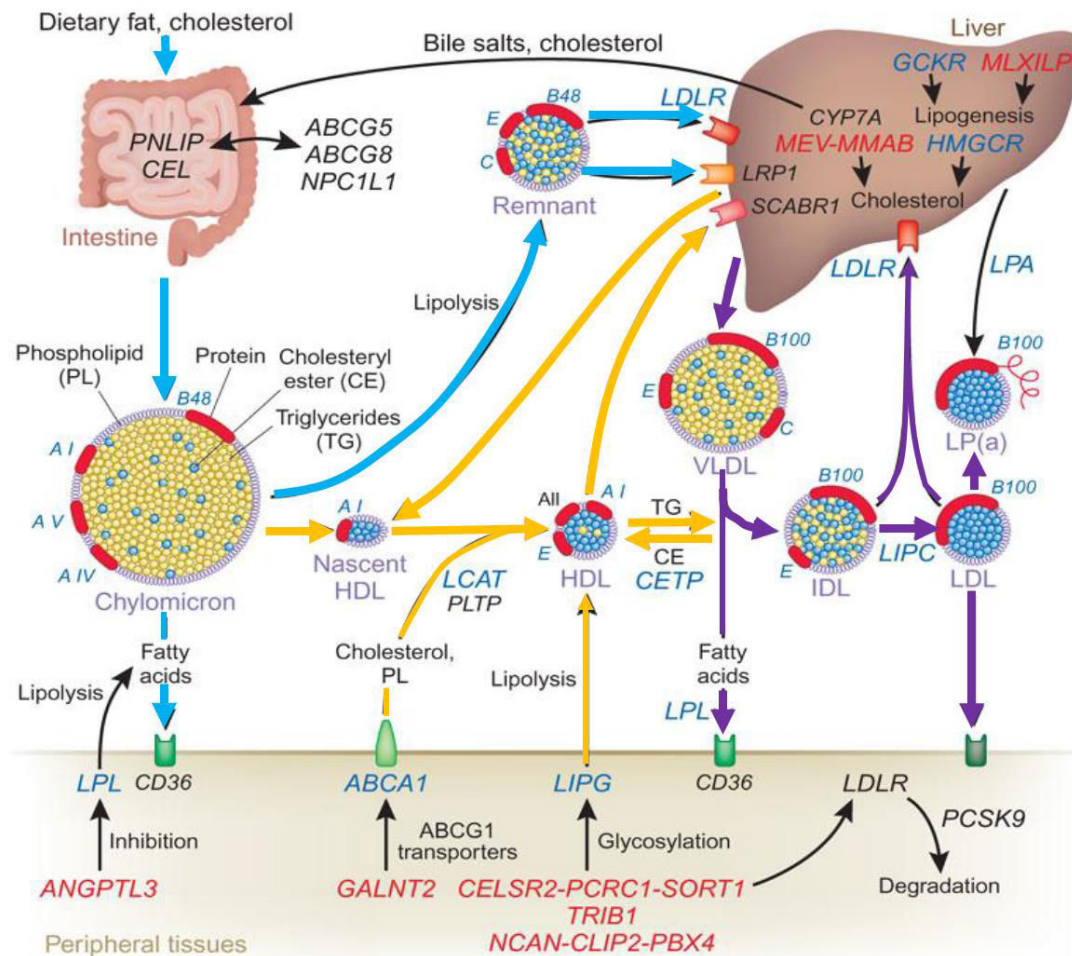


Figure 10 : Métabolisme général des lipoprotéines.

(d'après Lusi and Pajukanta, 2008). Les flèches bleues, violettes, orange désignent respectivement les voies exogène, endogène et de transport inverse.

3. Les récepteurs des lipoprotéines

Le rôle principal des récepteurs de lipoprotéines dans le métabolisme lipidique systémique est l'élimination des lipoprotéines de la circulation. Au niveau des tissus périphériques tels que le cœur, le tissu adipeux et le muscle squelettique, les TG sont extraits des lipoprotéines par l'action de différentes enzymes lipolytiques. Les enzymes agissent en présence de cofacteurs pour libérer les TG des lipoprotéines et permettre leur internalisation au niveau de l'endothélium des tissus périphériques. Les lipoprotéines peuvent aussi être captées par des récepteurs lipoprotéiques principalement au niveau du foie. Le ciblage correct des lipoprotéines

vers les sites de métabolisme et d'élimination est médié par les apolipoprotéines. Elles constituent l'élément de la lipoprotéine qui est reconnu lors de l'interaction des particules de lipoprotéines avec des enzymes, des protéines de transfert, et des récepteurs de surface cellulaire.

3.1. La superfamille du LDL-R

Tous les récepteurs de la superfamille du LDL-R procèdent à l'endocytose des lipoprotéines au moyen de vésicules recouvertes de clathrines suivie d'une dégradation lysosomale qui libère le cholestérol pour le métabolisme cellulaire (Chen *et al.*, 1990 ; Garcia *et al.*, 2001). La Figure 11 présente les membres de cette famille et leur structure.

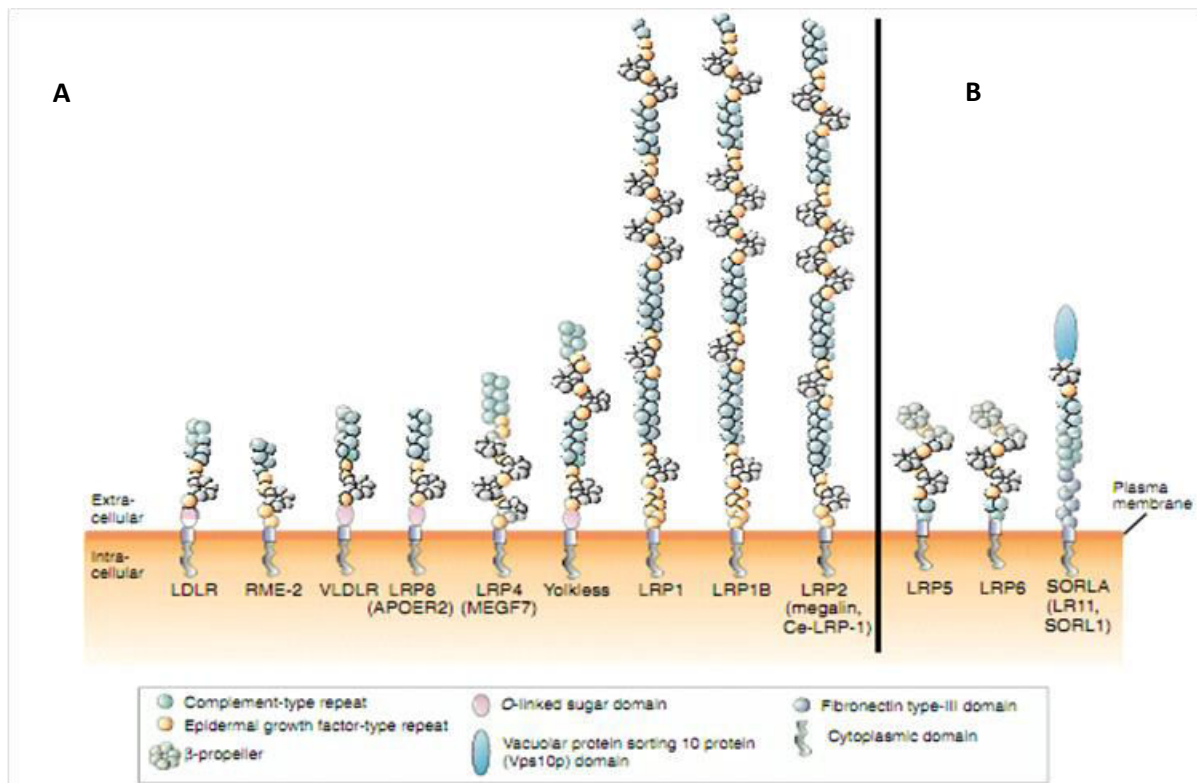


Figure 11 : Famille des récepteurs LDL-R.

(adapté de Willnow *et al.*, 2007). A: Récepteurs considérés comme les principaux membres de la famille LDL-R. B: Récepteurs plus éloignés, en raison d'un module inversé (LRP5/6) ou combiné à des motifs non retrouvés dans les autres récepteurs. Abréviations : APOER2, apo-E receptor 2 ; Ce, *C. elegans* ; LDLR, Low Density Lipoprotein Receptor ; LRP, LDL receptor-related protein ; MEGF7, multiple epidermal growth factor-type repeat containing protein 7 ; RME-2, receptor-mediated endocytosis-2 ; SORLA, sortilin-related receptor with A-type repeats ; VLDLR, very low-density lipoprotein receptor

Le récepteur LDL-R mature est une glycoprotéine membranaire très conservée de 839 résidus, composée de cinq domaines. A partir de l'extrémité N-terminale, ces domaines sont : (i) un domaine de liaison des ligands, (ii) un domaine qui présente un degré élevé d'homologie avec le facteur de croissance épidermique (EGF), (iii) un domaine qui contient un ensemble de chaînes O-glycosylées, (iv) un domaine transmembranaire, et (v) une courte région cytoplasmique.

- **Le domaine de liaison au ligand.** Le domaine extracellulaire en N-terminal correspond à un domaine de liaison des ligands (lipoprotéines contenant l'apoB100 ou l'apoE) qui renferme 7 séquences répétées de 40 résidus riches en résidus de cystéine et la séquence signature Ser-Asp-Glu (Esser *et al.*, 1988).
- **Le domaine d'homologie de précurseur du facteur de croissance épidermique (*Epidermal Growth Factor* ou EGF).** Cette région du récepteur LDL est adjacente au site de liaison au ligand et serait impliquée dans la dissociation acide-dépendante des LDL et dans le recyclage du récepteur. Ce domaine est constitué d'environ 400 acides aminés (Beglova and Blacklow, 2005).
- **Le domaine O-glycosylé.** Ce domaine du récepteur LDL est un cluster fortement O-glycosylé riche en résidus séryl et thréonyl, situé juste à l'extérieur de la membrane plasmique dont l'importance fonctionnelle n'est pas clarifiée (Davis *et al.*, 1986).
- **Domaine transmembranaire.** Le domaine d'ancrage à la membrane relie l'extrémité C-terminale au cluster O-glycosylé. Sa délétion entraîne la sécrétion d'une forme tronquée du récepteur.
- **Région cytoplasmique.** Ce domaine, constitué de 50 résidus, est impliqué dans l'adressage du récepteur aux vésicules riches en clathrines et dans la transduction du signal. L'internalisation du récepteur est dépendante du motif Asn-Pro-X-Tyr (NPxY) (Chen *et al.*, 1990 ; May *et al.*, 2005).

3.1.1. Le récepteur des LDL (LDL-R)

Ce récepteur a été identifié par Brown and Goldstein (1986) comme étant celui qui assure l'endocytose des LDL par interaction spécifique avec l'apoB100. Cependant, il capture aussi les VLDL par interaction avec l'apoE. Le récepteur mature est une glycoprotéine membranaire très conservée de 839 résidus. Le récepteur est synthétisé sous forme d'une protéine précurseur de 120 kDa dans le réticulum endoplasmique et est converti en une protéine de 160 kDa dans

l'appareil de Golgi (Tolleshaug *et al.*, 1982 ; Cummings *et al.*, 1983 ; Tolleshaug *et al.*, 1983). Il est exprimé dans une grande variété de tissus. L'expression la plus élevée se trouve au niveau hépatique, notamment dans les cellules parenchymateuses et aussi les cellules de Kupffer, dans la glande surrénale (Huettinger *et al.*, 1984 ; Gherardi *et al.*, 1991) , mais il a également été retrouvé dans les cellules du rein, de la rate, de l'aorte thoracique et du cœur (Gherardi *et al.*, 1991). C'est un élément clé dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol. En effet, après internalisation, les particules de LDL déclenchent phénomènes : 1) la réduction de l'expression du gène de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA-réductase (HMGCR) pour diminuer la biosynthèse du cholestérol; 2) le renforcement de l'activité de l'acyl-CoA cholestérol acyltransférase (ACAT) pour réduire le cholestérol libre et 3) la suppression de la synthèse des LDLR pour réduire l'absorption de LDL via SREBPs, (Brown and Goldstein, 1976 ; Shimomura *et al.*, 1997; Tamura and Shimomura, 2005).

3.1.2. Le VLDL-R

Le récepteur des VLDL est une protéine de 846 résidus d'acides aminés (Oka *et al.*, 1994). Sa structure ressemble fortement à celle du LDL-R et il reconnaît spécifiquement les lipoprotéines riches en TG contenant de l'apoE, comme les VLDL, les IDL et les chylomicrons. Toutefois, ce récepteur ne reconnaît pas les LDL contenant uniquement l'apoB100 (Takahashi *et al.*, 1992), alors que le LDL-R reconnaît principalement ces lipoprotéines. La distribution tissulaire de l'ARNm du VLDL-R est différente de celle du LDL-R. Le récepteur VLDL est très abondant dans les tissus impliqués dans le métabolisme des AG comme le cerveau (Nimpf and Schneider, 1998), le cœur, les muscles et le tissu adipeux, mais il est presque absent dans le foie (Takahashi *et al.*, 1992). Son rôle physiologique serait de délivrer des particules riches en TG aux tissus périphériques (Wyne *et al.*, 1996) ou d'immobiliser ces particules à la surface des cellules endothéliales pour faciliter l'action de la Lipoprotéine Lipase et permettre l'apport d'AGL aux tissus adjacents (Takahashi *et al.*, 1995). Le VLDL-R serait également impliqué dans la transduction du signal neuronal (D'Arcangelo *et al.*, 1999).

3.1.3. Le récepteur *lipoprotein receptor-related protein* (LRP)

Le récepteur LRP est comme un membre de la famille des LDL-R, identique au récepteur de l' α 2-macroglobuline comme l'a constaté Dudley Strickland (Qiu *et al.*, 2002). Le LRP est exprimé principalement dans le foie, mais peut aussi être trouvé dans de nombreux types cellulaires différents (Moestrup *et al.*, 1992) comme le cerveau et les poumons (Sugiyama *et*

al., 2000). Un dysfonctionnement du LRP *in vivo* résulte en une augmentation du taux de cholestérol et de TG dans la circulation (Willnow *et al.*, 1994 ; Rohlmann *et al.*, 1998), mais seulement en l'absence du LDLR, et joue donc un rôle de « back up au niveau hépatique ». De plus, une diminution de l'expression du LRP a été observée chez les rats âgés ; elle s'accompagne d'une clairance moins efficace des remnants de VLDL (Field and Gibbons, 2000).

3.2. Autres récepteurs des lipoprotéines

3.2.1. Les récepteurs éboueurs ou « scavenger receptors » (récepteurs SR)

Ils sont regroupés en différentes classes structurales :

Les récepteurs éboueurs (scavenger receptors) de classe A comprennent les produits de 3 gènes proches : SR-AI, SR-AII, SR-AIII, le récepteur des macrophages (MARCO) et le récepteur de la lectine de type C. Les récepteurs éboueurs de classe A sont des récepteurs dits de type II (extrémité C-terminale extracellulaire, région transmembranaire unique et un cytoplasmique N-terminale). Ce sont des glycoprotéines membranaires qui peuvent former des homotrimères. Les isoformes SR-AI et SR-AII peuvent se lient aux LDL modifiées, aux acides polynucléiques, à certains composants bactériens et certains ligands glucidiques (Dhaliwal and Steinbrecher, 1999). SR-AII est plus court que SR-AI : il ne renferme pas le domaine C-terminal riche en résidus de cystéine (Matsumoto *et al.*, 1990) mais conserve les séquences riches en résidus chargés positivement des *collagen-like repeats* qui semblent être importantes pour la reconnaissance du ligand (Doi *et al.*, 1993) L'épissage alternatif de l'ARNm génère l'isoforme SR-AIII qui ne contient que quatre des six résidus cystéine C-proximales trouvés dans SR-AI (Gough *et al.*, 1998). Bien que le domaine *collagen-like* impliqué dans la liaison de ligand soit présent dans SR-AIII, ce récepteur ne peut pas lier des ligands extracellulaires car il est confiné dans le réticulum endoplasmique des mammifères (ER) (Gough *et al.*, 1998). Le récepteur MARCO lie les LDL modifiées, les bactéries et les lipopolysaccharides (Kraal *et al.*, 2000 ; Sankala *et al.*, 2002).

Les récepteurs de classe B reconnaissent divers ligands dont le collagène, les AG, les phospholipides anioniques, la thrombospondine, les cellules apoptotiques, les LDL natives, les LDL oxydées, les HDL et les VLDL (Greenwalt *et al.*, 1992 ; Calvo *et al.*, 1998 ; Terpstra *et al.*, 2000). Les récepteurs éboueurs de classe B sont de type III (domaine transmembranaire multiple). Ce sont des glycoprotéines membranaires avec une topologie caractéristique en

«hairpin»: les deux régions transmembranaires sont situées à proximité des régions N- et C-terminales cytoplasmiques (Greenwalt *et al.*, 1992).

Le gène du récepteur scavenger de classe C (dSR-CI) de la mouche *Drosophila melanogaster* n'a pour l'instant pas d'homologues connus chez d'autres organismes eucaryotes. Ce récepteur est exprimé sur les hémocytes et les macrophages lors du développement embryonnaire des mouches (Pearson *et al.*, 1995). Il se lie au LDL acétylées et aux bactéries (Pearson *et al.*, 1995 ; Rämét *et al.*, 2001).

Les récepteurs scavengers de classe D comprennent les produits des gènes CD68 et de la *lysosomal membrane glycoprotein* (Lamp) (Jiang *et al.*, 1998). CD68 a la capacité de fixer les LDL oxydées (Ramprasad *et al.*, 1996). Il est exprimé sur les macrophages, les cellules de Langerhans, les cellules dendritiques et les ostéoclastes (Jiang *et al.*, 1998) alors que Lamp-1 et Lamp-2 sont exprimés dans un nombre plus important de cellules.

Le récepteur scavenger de classe E (LOX-1) a été identifié comme étant un récepteur scavenger endothélial spécifique, mais il peut être détecté sur les macrophages, les cellules de muscles lisses et les plaquettes (Chen *et al.*, 2002) . La N-glycosylation de LOX-1 est nécessaire à la fois pour le transport à la surface des cellules et pour la haute affinité de liaison pour les LDL oxydées (Kataoka *et al.*, 2000).

Les récepteurs scavenger de classe F exprimés par les cellules endothéliales (SRECS) sont situés sur l'endothélium chez les mammifères et chez les vers (Adachi *et al.*, 1997). Les gènes *srec-I* (Adachi *et al.*, 1997) et *srec-II* (Ishii *et al.*, 2002) sont localisés sur les chromosomes humains 17 et 22 respectivement. Les ligands de SREC-I comprennent les LDL oxydées, les LDL acétylées, l'acide polyinosinique et un facteur de liaison de l'actine, l'advilline (Adachi *et al.*, 1997 ; Shibata *et al.*, 2004). SREC-I internalise les LDL modifiées pour leur dégradation cellulaire (Adachi *et al.*, 1997). En revanche, SREC-II ne semble pas internaliser les LDL modifiées (Ishii *et al.*, 2002) mais son rôle physiologique n'est pas clairement établi.

Les récepteurs scavengers de classe G sont exprimés dans l'endothélium, les muscles lisses et les macrophages. SR-PSOX/CXCL16 peut se lier à la phosphatidylsérine, aux LDL oxydées et la chemokine CXCL16 (Shimaoka *et al.*, 2000 ; Shimaoka *et al.*, 2003).

Les récepteurs scavenger de classe H contiennent les protéines FEEL-1 et FEEL-2, qui partagent 39,8% d'identité de séquence (Adachi and Tsujimoto, 2002) FEEL-1 et FEEL-2 se

lient aux bactéries Gram négatif et aux bactéries Gram-positif. Elles peuvent jouer un rôle dans la défense contre les infections bactériennes et dans la pathologie du diabète (Adachi and Tsujimoto, 2002 ; Tamura *et al.*, 2003). FEEL-1 peut réaliser l'endocytose des LDL acétylées (Prevo *et al.*, 2004).

3.2.2. Le récepteur *lipolysis stimulated lipoprotein receptor* (LSR)

Le destin des CM d'origine intestinale et leur influence sur le statut lipidique est longtemps resté un sujet mal compris. Le foie était considéré comme l'organe responsable de leur clairance selon un processus impliquant un récepteur spécifique, mais ce récepteur est resté longtemps non identifié. En effet, l'épuration des résidus de CM est quasiment normale chez des patients déficients en récepteurs spécifiques des LDL (Rubinsztein *et al.*, 1990), ce qui atteste la présence d'un second récepteur pour les lipoprotéines riches en TG comme les CM (Havel and Kane, 1995). La protéine LRP (*LDL receptor related protein*), initialement reconnue comme un homologue du récepteur aux LDL, puis identifiée comme le récepteur de l'alpha2-macroglobuline, a été proposée comme récepteur des résidus de CM (Herz and Strickland, 2001; Rohlmann *et al.*, 1998). L'inactivation sélective de LRP *in vivo* n'est cependant pas accompagnée d'une hyperlipidémie significative. Bien que plusieurs études aient suggéré l'implication du récepteur LRP dans un rôle *back-up* pour l'élimination des résidus de CM du plasma, la littérature indique la présence d'une troisième voie hépatique impliquée dans l'épuration de ces particules.

Bihain et Yen ont découvert en 1992 un récepteur aux lipoprotéines génétiquement distinct du récepteur aux LDL, activé par les AGL lorsqu'ils ont montré que des fibroblastes humains (FH) portant une délétion pour 2 allèles du LDL-R étaient capables de fixer et dégrader les LDL en présence d'oléate dans le milieu culture (Bihain and Yen, 1992).

Ce récepteur, appelé LSR (*lipolysis simulated lipoprotein receptor*) a été identifié comme un acteur important pour la clairance des lipoprotéines riches en triglycérides pendant la phase post-prandiale (Yen *et al.*, 2008), ce qui a été confirmé par Narvekar *et al.* (2009) qui ont observé une hypertriglycéridémie à la suite de la suppression transitoire *in vivo* du LSR hépatique. Alors que l'absence des deux allèles du gène *lsr* est létale au niveau stade embryonnaire (Mesli *et al.*, 2004), une réduction de 50% de l'expression de ce récepteur (chez les animaux hétérozygotes LSR^{+/-}) conduit à une augmentation de la lipémie postprandiale de

2 à 4 fois, avec une diminution de 2 fois de la clairance des lipides par rapport aux animaux contrôles (Yen *et al.*, 2008).

Par ailleurs, la séquence protéique déduite de l'ADN correspondant ne présente pas d'homologie avec les récepteurs de la famille LDL-R (Dergunov, 2004 ; Rhainds and Brissette, 1999).

L'expression du gène *lsr* (souris) conduit à la biosynthèse simultanée de 3 chaînes peptidiques α (68 kDa), α' (63,8 kDa), et β (56 kDa), associées par des ponts disulfure. Issues de l'épissage différentiel d'un même ARNm précurseur, ces 3 chaînes présentent des séquences très similaires (Yen *et al.*, 1999). Il avait été initialement proposé que le récepteur soit un hétérotrimère ou hétérotétramère composé d'une sous-unité de 68 kDa (α ou α') et de deux à trois sous-unités de 56 kDa (β) associées par des ponts disulfure (Yen *et al.*, 1999). Cependant, des travaux récents de Nazir Ahmad au laboratoire (Ahmad *et al.*, 2012) ont montré que la structure quaternaire du récepteur correspondait plus vraisemblablement à une structure de type $\alpha\alpha'\beta_2$ pour une masse moléculaire apparente du complexe de 248 kDa (masse théorique 246,2 kDa). La sous-unité β ne dispose pas des signaux de ciblage lysosomal putatif, du domaine transmembranaire et du domaine riche en cystéine, mais contient les domaines de liaison de ligand (Figure 12). De plus, la co-transfection des sous-unités α et β est suffisante pour reconstituer l'activité LSR dans les cellules (Yen *et al.*, 1999).

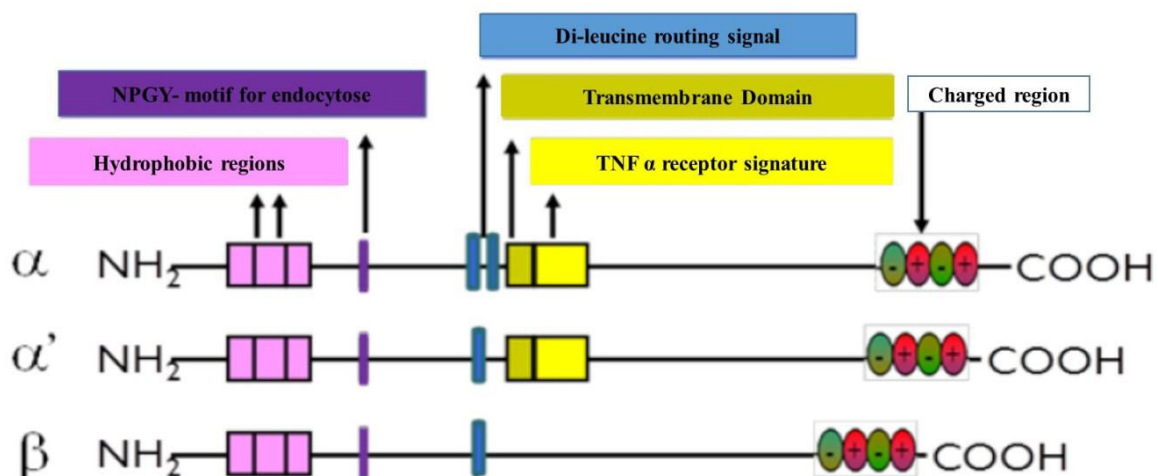


Figure 12 : Représentation schématique de la sous-unité α et des régions absentes dans les sous-unités α' et β , suite au mécanisme d'épissage alternatif. (adapté de Yen *et al.*, 1999).

3.2.2.1. Activation et changement de conformation du LSR

L'activation du LSR par les AG libérés par la lipolyse constitue la première étape de l'absorption des lipoprotéines. Les travaux biochimiques réalisés sur le LSR amènent à la conclusion que l'interaction directe des AGL avec la protéine conduit à changement conformationnel qui démasquerait une série de résidus chargés qui constituerait le site de fixation des lipoprotéines. Ce changement de conformation apparente est totalement réversible lorsque le site de liaison de ligand est inoccupé (Mann *et al.*, 1995). Il reste cependant non caractérisé.

3.2.2.2. Implication du LSR dans la clairance des particules riches en TG

Les lipides d'origine alimentaire sous forme de CM circulent dans le sang. Après un repas, la phase dite post-prandiale, la concentration de ces particules riches en TG exogènes augmente dans la circulation. La lipémie post-prandiale, lorsque son niveau est élevé, contribue de façon importante à la distribution des lipides parmi les différents tissus périphériques (Figure 13). Le LSR est impliqué dans l'épuration des lipides d'origine alimentaire (Yen *et al.*, 2008). Ce récepteur lie les lipoprotéines contenant une apoB et/ou une apoE et présente une forte affinité pour les lipoprotéines riches en TG, principalement les CMR (Yen *et al.*, 1994 ; Mann *et al.*, 1995).

Aujourd'hui, il est établi que l'activation de LSR par des AGL conduit à la fixation, l'absorption et la dégradation de lipoprotéines contenant de l'apoB ou l'apoE dans des modèles cellulaires, y compris les fibroblastes. Le LSR est donc impliqué dans la dynamique de la distribution des lipides entre le foie et les tissus périphériques (Figure 13).

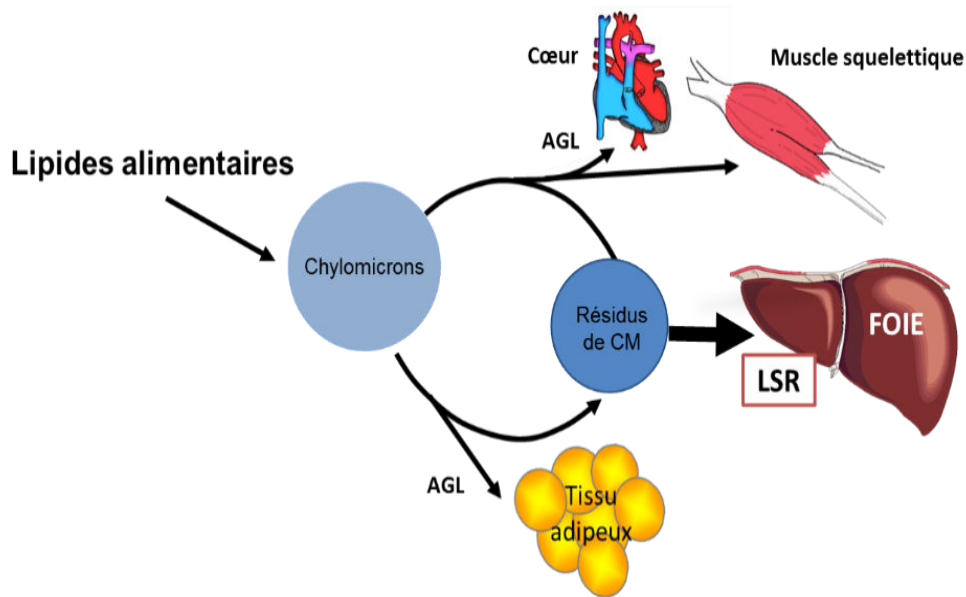


Figure 13 : Capture des lipides alimentaires sous forme de chylomicrons pendant la phase postprandiale. Les lipides d'origine alimentaire circulent dans le sang sous forme de CM.
 L'hydrolyse des CM sous l'action des lipases libère des acides gras libres (AGL) dans le sang. Ces AGL activent le récepteur LSR, qui capte ces particules lipidiques et les élimine par endocytose, régulant ainsi la quantité de lipides distribués aux tissus périphériques, notamment aux tissus adipeux (Yen, communication personnelle).

Alors que l'absence des deux allèles du gène *lsr* est létale au niveau stade embryonnaire, une réduction de 50% de l'expression de ce récepteur (chez les animaux hétérozygotes $LSR^{+/-}$) conduit à une augmentation de la lipémie postprandiale de 2 à 4 fois, avec une diminution de 2 fois de la clairance des lipides par rapport aux animaux contrôles (Yen *et al.*, 2008). De plus, sous un régime hyperlipidique contenant du cholestérol, les animaux hétérozygotes $LSR^{+/-}$ présentent une augmentation des lipoprotéines riches en TG ainsi que des dépôts lipidiques dans l'aorte. Par conséquent, l'expression et l'activité de ce récepteur sont directement liées à l'homéostasie lipidique et donc énergétique, et la réduction de l'activité du LSR se traduit par une augmentation des lipides dans la circulation pendant la phase post-prandiale suivie par une augmentation progressive de poids. Le LSR représente donc une cible importante pour la régulation de la lipémie post-prandiale.

Les expériences réalisées sur la distribution du LSR par le Pr Michel Darmon et son groupe (Mesli *et al.*, 2004), ont démontré que chez la souris adulte, l'ARNm correspondant au transcrite LSR était détecté dans tous les tissus testés, sauf les muscles et le cœur, et était présent en quantité abondante dans le foie, les poumons, les intestins, les reins, les ovaires et les testicules. Ils ont, de plus, retrouvé les transcrits de tous les récepteurs des lipoprotéines testés, y compris

le LSR, dans les organes stéroïdogènes comme les glandes surrénales, les testicules et les ovaires (Mesli *et al.*, 2004).

Une autre étude réalisée au laboratoire montre une redistribution importante du cholestérol membranaire au niveau du système nerveux central (SNC) chez les souris LSR^{+/-} âgées de 18 mois, suggérant que le LSR puisse avoir un rôle dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol dans le SNC (Stenger *et al.*, 2012). Quand ces souris sont soumis à un stress amyloïde sous forme d'une injection *icv* d'oligomères solubles du peptide β -amyloïde, une augmentation de l'altération de l'apprentissage et de marqueurs pré et post-synaptiques est observée (Pinçon *et al.*, manuscrit en révision). Une évaluation de l'expression du LSR au niveau du cerveau démontre que ce récepteur est présent dans les structures cérébrales importantes pour les capacités cognitives et le métabolisme énergétique, ainsi que dans la barrière hémato-encéphalique.

3.2.2.3. Modulation de l'expression de LSR au niveau hépatique

Des concentrations physiologiques en leptine, un facteur de satiété, augmentent le taux de transcription du gène *lsr* et l'expression de la protéine LSR à la surface des hépatocytes (Stenger *et al.*, 2010). Il est par ailleurs connu que la liaison de la leptine à son récepteur (Ob-Rb) conduit à l'activation de la voie JAK / STAT et à la phosphorylation d'une kinase (ERK), et par conséquent, à une augmentation de la transcription des gènes codant pour des hormones anorexigènes. L'absence de leptine ou de l'inhibition de la signalisation de la leptine est suffisante pour conduire à une augmentation de la prise alimentaire et, par conséquent, à une augmentation de la masse grasse, associée à une intolérance au glucose (Brabant *et al.*, 2005). Des cas de résistance à l'action de la leptine ont été décrits chez des sujets obèses. Chez ces sujets, l'expression du LSR est faible, ce qui pourrait conduire à une diminution de l'absorption des CM et à une lipémie post-prandiale élevée (**Figure 14**) (Stenger *et al.*, 2010).

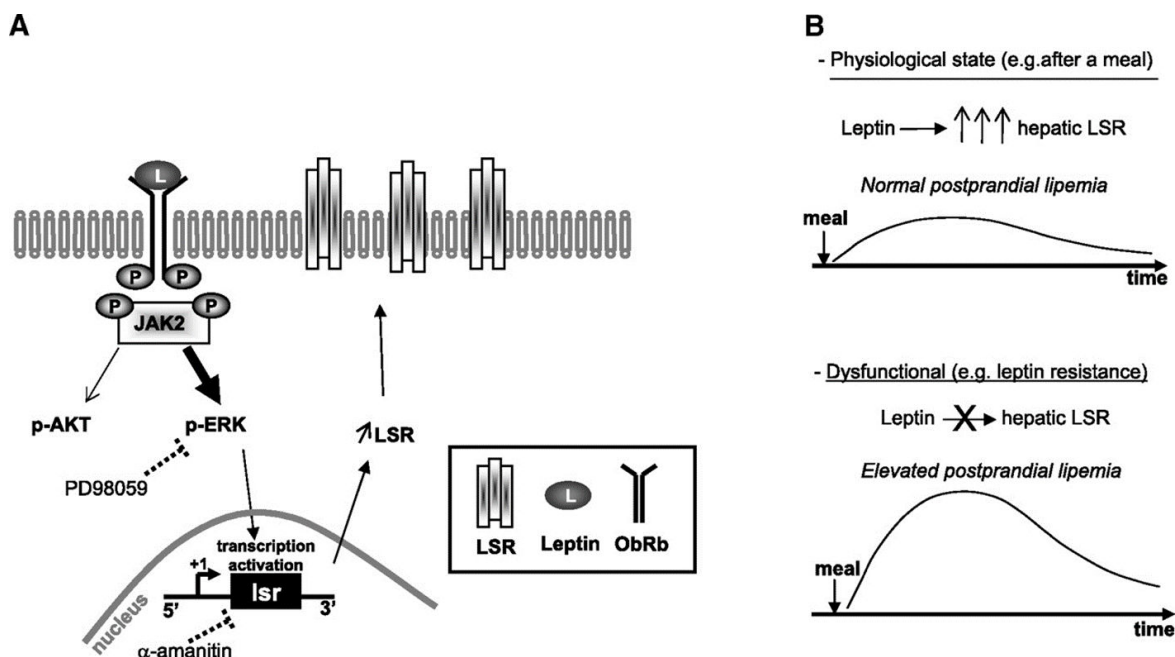


Figure 14 : Schéma illustrant l'effet de la leptine sur l'expression du LSR.

A. Activation transcriptionnelle du gène *lsr* sous l'action de la leptine. L'interaction entre la leptine et son récepteur, *Ob-Rb*, conduit à une cascade de signalisation canonique (phosphorylation de la protéine *Erk*), induisant la transcription du gène *lsr* et l'augmentation du niveau protéique de *LSR* à la surface cellulaire. **B. Effet de la leptine sur la lipémie postprandiale.** Dans les conditions physiologiques, l'effet de la leptine permet la clairance des lipoprotéines pendant la phase postprandiale. Quand l'interaction entre la leptine et son récepteur ne fonctionne plus (par exemple, pour les cas de résistance à la leptine observés dans le phénomène d'obésité), l'expression protéique du *LSR* à la surface cellulaire est sous-optimale, conduisant à une diminution de l'efficacité de la capture des *CM*, et par conséquent, à une lipémie postprandiale élevée (Stenger *et al.*, 2010).

3.2.2.4. Autres rôles du LSR

Outre son rôle dans l'homéostasie lipidique et la distribution des lipoprotéines, des études réalisées par d'autres groupes de recherche ont mis en évidence d'autres rôles pour ce récepteur. En effet, il a été démontré que le récepteur *LSR* était le récepteur par lequel les toxines *CDT* (*Clostridium Difficile Transferase*), *iota* (*Clostridium perfringens*), et *CST* (*Clostridium spiroforme*) pénètrent les cellules hôtes (Papatheodorou *et al.*, 2011 ; Papatheodorou *et al.*, 2012). Par ailleurs, une étude a démontré que la tricelluline et le *LSR* sont des composants protéiques des jonctions tricellulaires serrées (*TJ*). Ces jonctions serrées constituent le point de rencontre de 3 cellules épithéliales et permettent de « sceller » l'espace cellulaire (Figure 15). Le *LSR* est nécessaire au maintien de la fonction de la barrière épithéliale par son implication dans le recrutement de la tricelluline au niveau des *TJ* (Masuda *et al.*, 2011). Enfin, il a été montré que le *LSR* était exprimé dans des tissus tumoraux impliqués dans le cancer ovarien. Le

gène *lsr* a été identifié comme l'un des 30 gènes marqueurs de tumeurs potentiels (Welsh *et al.*, 2001). Le LSR serait aussi impliqué dans l'invasion et les mouvements cellulaires lors de cancer de la vessie (Herbsleb *et al.*, 2008).

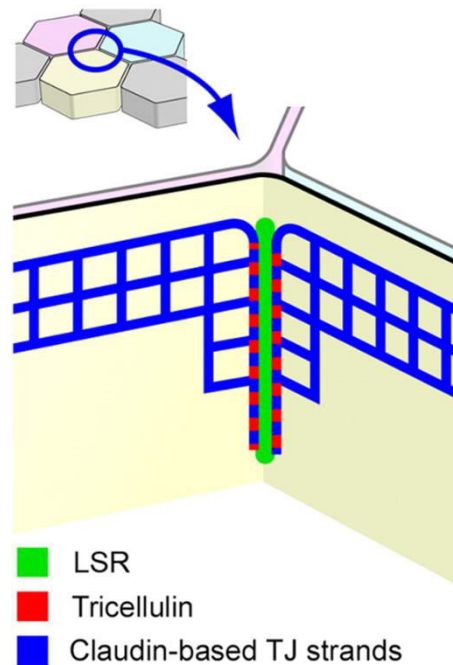


Figure 15 : Modèle de l'organisation des jonctions tricellulaires serrées et rôle du LSR.
Dans ce modèle, la tricelluline joue le rôle de « colle » qui fixe les claudin-based TJ strands. Le LSR est localisé à la base de ces jonctions cellulaires et fixe la tricelluline (Masuda *et al.*, 2011).

III. Contexte de l'étude et objectifs de la thèse

Ainsi que nous l'avons détaillé dans l'introduction, des études récentes suggèrent que l'exposition aux produits chimiques environnementaux est impliquée dans l'étiologie de l'obésité.

Cependant, l'effet des polluants organiques persistants (POP) sur le métabolisme lipidique au niveau hépatique a été peu étudié. Une étude très récente de Castelli *et al.* (2014) montre une corrélation positive entre d'une part, l'expression au niveau ARN messenger de gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme lipidique, le développement de stéatose hépatique et d'autre part, les concentrations de POP accumulées chez le phoque annelé. Ces auteurs concluent que le métabolisme lipidique pourrait être affecté par l'exposition aux contaminants.

Or, le foie joue un rôle central pour le transport des lipides et des lipoprotéines qui partent ou viennent du tissu adipeux et du muscle. L'objectif de cette étude était donc d'élucider le rôle de micropolluants persistants, présents en tant que contaminants dans l'alimentation, sur l'homéostasie lipidique et sur l'expression et l'activité d'acteurs du métabolisme des lipoprotéines.

Nos études se sont focalisées majoritairement sur trois protéines membranaires importantes pour le métabolisme lipidique au niveau de foie :

- ✓ *Le Lipolysis stimulated lipoprotein receptor (LSR)* pour son rôle dans l'absorption et l'élimination des lipoprotéines riches en TG contenant ApoB-et/ou l'ApoE lors de la phase post-prandiale (Bihain and Yen, 1992; Yen *et al.*, 1994, 2008), et dont le rôle, la régulation, ainsi que l'étude des relations structure-fonction constituent l'un des axes de recherche de l'équipe.

- ✓ *Le Low density lipoprotein receptor (LDL-R)* qui contribue à l'élimination des LDL et lipoprotéines résiduelles de la circulation en se liant à l'apolipoprotéine B-100 (apo B-100) et de l'apolipoprotéine E (ApoE) et joue un rôle majeur dans la régulation du taux de cholestérol plasmatique chez l'homme (Brown and Goldstein, 1986).

- ✓ L'ATP-binding cassette transporter (ABCA1) qui est un transporteur impliqué dans le transfert du cholestérol et des PL à l'apoA-I pour former les HDL. L'importance d'ABCA1 dans la genèse des HDL est illustrée par la maladie de Tangier, pour laquelle le déficit homozygote en ABCA1 associe une quasi-absence de HDL et une surcharge en cholestérol dans de nombreux tissus, en particulier les amygdales, le foie, la rate, et la muqueuse intestinale (Remaley *et al.*, 1999).

Cependant, nos études nous ont amené également à porter notre attention sur d'autres acteurs impliqués dans le métabolisme du cholestérol, tels que le *scavenger receptor* SR-B1, le transporteur ABCG1, et les *Acyl-CoA:cholesterol acyltransferases* ACAT1 et ACAT2. Concernant les polluants, notre choix s'est porté sur des membres de la famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques, famille sur laquelle l'équipe MRCA a réalisé de nombreuses études, et dont l'intérêt est lié entre-autres à leur persistance dans l'environnement et à leur fort potentiel de bioaccumulation dans la chaîne alimentaire. Nous avons initié ces travaux sur 3 représentants de cette famille partageant des propriétés physicochimiques très voisines, le benzo[*a*]pyrène, pour lequel une étude précédente avait déjà mis en évidence un effet de ce composé sur le poids d'animaux traités par voie *i.p.* (Irigaray *et al.*, 2006), le phénanthrène et le pyrène.

MATERIELS ET METHODES

I. Etudes Animales

1. Animaux utilisés et conditions d'hébergement

Une partie des études a porté sur des souris sauvages C57Bl6/J mâles fournies par Charles River Laboratories (L'Arbresle, France) âgées de 10 semaines. Les souris ont été maintenues dans une animalerie agréée et certifiée pour l'hébergement de souris OGM avec un cycle jour/nuit de 12h/12h, une température de 21 à 22°C et une hygrométrie de 50 ± 20%.

2. Traitements

2.1. Régimes

Les souris ont reçu le régime standard 2018S de Harlan Teklab (Gannat, France) et de l'eau *ad libitum*.

2.2. Administration du B[a]P par voie *intra-péritonéale* (i.p.)

Toutes les expériences ont commencé vers 9 heures du matin, c'est-à-dire, à la fin de la période d'activité nocturne. Le B[a]P (Sigma-Aldrich) a été solubilisé dans du sérum physiologique contenant 5% de diméthylsulfoxyde (DMSO) et 1% de carboxyméthylcellulose (CMC). Les souris ont reçu leur première injection par voie *i.p.* de B[a]P (0,5 mg/kg de masse corporelle) ou une injection du véhicule seul, et cette injection a été répétée toutes les 48 heures pendant 2 semaines.

3. Suivi de la prise de poids et de la prise alimentaire

Le poids corporel et la consommation alimentaire ont été mesurés individuellement pour chaque souris par pesée toutes les 48h.

4. Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins ont été réalisés par prélèvement sous-mandibulaire des souris sous anesthésie gazeuse (isoflurane) à 9 heures et 12 heures après 4 h de privation de nourriture. Un volume total de 100 µL de sang a été récupéré dans un tube en polypropylène contenant 5% d'EDTA lors de chaque prélèvement par capillarité en utilisant une pipette pasteur. Le plasma a été immédiatement collecté après une centrifugation de 5 minutes à 10 000 rpm puis analysé

immédiatement (dosage des TG ou du cholestérol total (TC)) ou stocké à -20°C pour des analyses ultérieures.

5. Prélèvements tissulaires

Le jour 16, lors du sacrifice, les animaux ont été sacrifiés par ponction cardiaque. Un échantillon de tissu adipeux épидидymaire ainsi qu'un muscle gastrocnémien ont été rapidement prélevés, rincés avec du PBS froid, placés dans des microtubes et plongés dans l'azote liquide pour le stockage à -80°C. Une partie de l'échantillon de foie (environ 100 mg) a été placée dans un volume approprié de RNeasy Lysis Reagent (Qiagen) selon les instructions du fournisseur, et stockée à 4°C pendant une nuit, puis à -80°C jusqu'à son utilisation pour l'extraction d'ARN. Le reste de l'échantillon de foie a été congelé instantanément dans de l'azote liquide et stocké à -80°C jusqu'à son utilisation pour la préparation de membranes totales.

6. Extraction lipidique

Environ 50 mg d'échantillon de tissu congelé ont été déposés dans un tube et lyophilisés durant 5 h. Suite à la lyophilisation, 100 à 200 µL d'une solution de chloroforme/méthanol (2:1, v/v) ont été ajoutés au tube et l'ensemble a été passé au vortex pendant 1 minute toutes les 20 minutes durant 1h. La solution de chloroforme/méthanol a ensuite été récupérée dans un autre tube et l'extraction a été renouvelée deux fois. Les dosages lipidiques ont été réalisés après évaporation d'une faible quantité de cette solution (10-50 µL) avant l'ajout du réactif du kit de dosage. Les valeurs obtenues tiennent compte des dilutions réalisées (quantité de solution ajoutée à chaque extraction et quantité utilisée pour l'évaporation et le dosage).

7. Profil lipoprotéique

Une quantité de 210 µL d'échantillon de plasma a été ajoutée à 290 µL de tampon phosphate 30 mM contenant 150 mM NaCl, 1 mM EDTA et 0,02 % d'azide de sodium, pH 7,4. L'ensemble a été déposé sur une colonne Superose 6 10-300 GL (GE Healthcare) équilibrée avec le même tampon et reliée à un système AKTA Explorer 10 avec un débit de 0,2 mL/min. Trente fractions de 500 µL ont été collectées sur lesquelles les lipides (TC et TG) ont été analysés.

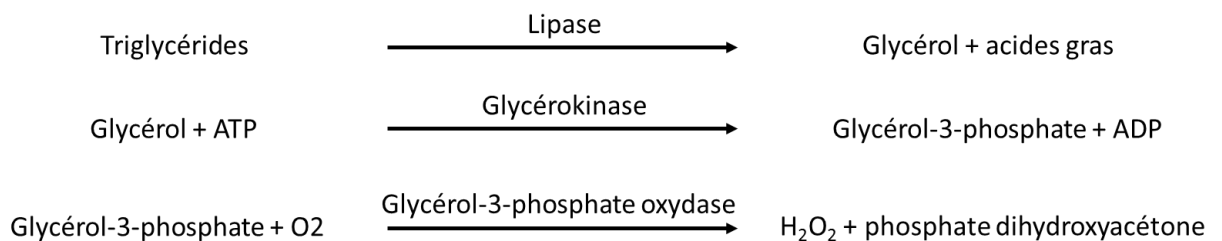
8. Analyses biochimiques

8.1 Dosages lipidiques

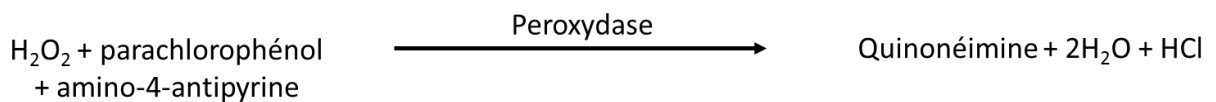
Les kits enzymatiques de dosage des lipides (TG et TC) ont été fournis par Biomérieux (Craponne, France) et le kit de dosage des PL a été fourni par mti-diagnostics (Idstein, Allemagne).

8.2 Dosage des triglycérides

Le principe de dosage des TG provenant d'un échantillon plasmatique ou tissulaire est le suivant :



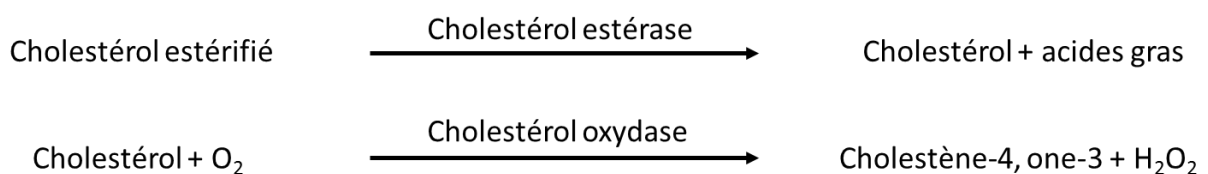
L'eau oxygénée formée est dosée selon une réaction de Trinder :



L'absorbance de la quinonéimine, mesurée à une longueur d'onde de 505 nm, est proportionnelle à la quantité de TG présente dans l'échantillon.

8.3 Dosage du cholestérol total

Le taux de TC des échantillons plasmatiques ou tissulaires a été dosé selon le principe suivant :



chacun des étalons et les échantillons de protéine ont été ajoutés, suivis par l'addition de 200 μ L du réactif de travail BCA, préparées comme recommandé par le fournisseur par le mélange de 50 volumes de réactif A (contenant 1% (w/v) de BCA, 2% (w/v) de carbonate de sodium, 0,16% (w/v) de tartrate de sodium et de 0,95% (w/v) de bicarbonate de sodium à 0,1 M d'hydroxyde de sodium) avec un volume de réactif B (contenant 4% (w/v) de sulfate de cuivre). La plaque d'échantillons a ensuite été incubée à 37°C pendant 30 min et lue à 570 nm dans un lecteur de microplaques (Fluostar Galaxia ; BMG Labtech France).

8.5.2 Méthode modifiée de Lowry

Le dosage par la méthode modifiée de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) est basé sur l'interaction entre le cuivre alcalin et les liaisons peptidiques qui entraîne la formation d'un complexe coloré (violet pourpre) dont l'absorbance à 750 nm est proportionnelle à la concentration en protéines.

Une gamme étalon a été préparée en utilisant de la BSA purifiée. Chaque échantillon a été dosé en double. Une dilution de chaque échantillon a été préparée, à laquelle a été ajouté le réactif C composé de 1% de réactif B (4% $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) et 99% de réactif A (2% Na_2CO_3 , 0,16% Na-Tartrate, 0,2% SDS, 0,4% NaOH), puis ce mélange a été laissé 30 minutes sous agitation à température ambiante. Le réactif D (Réactif de Folin Ciocalteu dilué 1 : 1 (v/v) dans l'eau) a été ajouté et incubé sous agitation à température ambiante durant 20 minutes. Pour finir, 200 μ L de cette solution ont été déposés dans une plaque 96 puits afin d'être dosés par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 750 nm.

II. Les études cellulaires

1. Conditions

La lignée cellulaire, Hepa1-6, est dérivée d'un hépatome de la souris. Ces cellules expriment le LSR et ont été utilisées précédemment comme modèle cellulaire *in vitro* pour déterminer les interactions du LSR avec différentes molécules telles que la leptine et la lactoferrine (Stenger *et al.*, 2010 ; Ahmad *et al.*, 2012). Les cellules expriment également le LDL-R et ABCA1, ce qui en fait un modèle intéressant pour les expériences *in vitro*, dont les résultats peuvent en outre être comparés à ceux issus d'expériences *in vivo* utilisant des souris.

La lignée cellulaire Hepa1-6 a été fournie par la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ). Les cellules ont été maintenues en milieu Dulbecco's modified

Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen ; Ref. 41965-039) complété avec 10% de sérum de veau foetal traité à 56°C pendant 30 min (heat inactivated serum) afin d'inactiver le système du complément (FBS), 2 mM de L-glutamine, à 37°C et 5% de CO₂ / 95% air ambiant. Le nombre de passages est toujours resté inférieur à 10. Pour les besoins de l'étude, les cellules ont été placées à raison de 100 000 ou 200 000 cellules/puits dans des plaques 12 ou 6 puits (BD Falcon™) pour les tests protéiques et l'extraction de l'ARN par la suite. Cependant, les cellules ont été étalées à 50 000 cellules/puits dans des plaques 24 puits avec ou sans lamelles respectivement pour les analyses d'immunofluorescence ou les tests de viabilité cellulaire. 48h après l'ensemencement (lorsque la confluence a atteint environ 80%), les cellules ont été lavées avec tampon phosphate salin 1X (PBS : 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, KH₂PO₄ 1,47 mM, pH 7,4) et traitées avec différentes molécules de polluant, B[a]P, pyrène et phénanthrène pour les tests de toxicité ou pour l'immunofluorescence.

2. Traitements

2.1. Exposition aux HAP

Différentes concentrations de chaque polluant ont été préparées dans du DMSO (Sigma) par dilutions en cascade à partir d'une concentration mère (0,1M). Les cellules Hepa1-6 à confluence ont été lavées avec du PBS puis incubées pendant 1 à 2h à 37°C avec du milieu frais contenant des concentrations finales de 0,1 ; 1 ; 10 ; 100 et 1000 µM en B[a]P, en pyrène ou en phénanthrène, à une concentration finale en DMSO de 1%. Les cellules contrôles ont été traitées avec le DMSO 1% seul. Le PBS et les milieux ont été préchauffés à 37°C avant mise en contact avec les cellules en culture.

2.2. Exposition à la lactacystine

Les cellules Hepa1-6 ont été cultivées en plaques 12 puits dans le milieu complet DMEM, et la lactacystine (en solution dans du DMSO à une concentration de 1 mM) a été ajoutée à une concentration finale de 10 µM à 24 ; 40 ; 44 ou 46 heures après ensemencement. Les cellules ont été récoltées 48 heures après ensemencement pour les expériences de Western blot. Pour les expériences en présence de B[a]P, les cellules Hepa1-6 ont été pré-incubées durant 1h à 37°C avec 10 µM de lactacystine ou 1% (v/v) de DMSO utilisé comme contrôle, puis une incubation supplémentaire de 1 heure en présence de 0,1 µM de B[a]P a été réalisée.

2.3. Exposition au B[a]P en présence de chloroquine

Les cellules Hepa1-6 ont été pré-incubées durant 2 h à 37°C avec 20 µM de chloroquine (concentration finale) ou dans du PCB (1X) pour les contrôles. Le milieu a été renouvelé et les cellules ont à nouveau été incubées pendant une heure en présence chloroquine (20 µM) et de B[a]P à une concentration finale de 0,1 µM.

3. Test de viabilité cellulaire

3.1. Test MTT

Les effets du traitement au HAP sur la viabilité cellulaire a été évaluée par un test colorimétrique au MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium ; Sigma-Aldrich) qui détecte l'activité des déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes par leur capacité à réduire le MTT en un produit bleu insoluble dans l'eau, le formazan (Mosmann, 1983). Les cellules à confluence (48 h après l'ensemencement) ont été traitées avec différentes concentrations de HAP : 0,1 ; 1, 10, 100, 1000 µM. Après 1 h d'incubation à 37°C en présence de B[a]P, de pyrène ou de phénanthrène, chaque puits a été incubé avec 100 µL de MTT (5 mg/mL dans du PBS; concentration finale de MTT : 2 mM) à 37°C pendant 10 min sous une atmosphère composée à 95% d'air et 5% de CO₂. Le milieu contenant du MTT a été éliminé et 450 µL de DMSO ont été ajoutés dans chaque puits. Les cellules ont été incubées pendant 10 minutes à température ambiante avec une agitation maximale. Des aliquotes de 100 µL de chaque puits ont été ajoutées à une plaque à 96 puits et l'absorbance a été lue à 570 nm dans un lecteur de microplaques.

3.2. Test de la calcéine

Le dérivé acéto-méthoxy de calcéine (calcéine-AM) est un ester acétique de la fluorescéine, non-fluorescent, qui traverse passivement les membranes cellulaires. Une fois dans le compartiment intracellulaire, il est transformé par les estérases cytosoliques en calcéine fluorescente qui n'est retenue à l'intérieur des cellules que par les cellules possédant une membrane plasmique intacte. Comme les cellules mortes n'ont pas d'estérases actives, seules les cellules vivantes transforment le calcéine-AM en calcéine dont le signal fluorescent est mesurable à 530 nm et peut être considéré comme proportionnel à la viabilité cellulaire. De plus, la diminution de l'activité estérasique intervenant dans la transformation de la calcéine-AM en calcéine fluorescente est caractéristique des cellules sénescents, en apoptose ou

soumises à l'action de substances toxiques. Associés à la fuite de la calcéine hors des cellules en raison de la perméabilisation de leur membrane, ces deux mécanismes complémentaires font de la mesure de la calcéine un excellent test de viabilité cellulaire et de cytotoxicité.

Les effets du traitement par le B[a]P, le pyrène et le phénanthrène sur la viabilité cellulaire ont été évalués par le test colorimétrique de la calcéine (calcéine-AM, Ref. C-3099, Invitrogen). Après 48h, les cellules ont été traitées avec différentes concentrations de HAP, soient 0,1 ; 1 ; 10 ; 100 et 1000 μM . Après 1 h d'incubation à 37°C en présence de HAP, le milieu de culture a été aspiré et les cellules ont été rincées une fois avec 500 μL par puits de PBS 1X. Puis, 250 μL d'une solution de calcéine-AM à 2 μM ont été ajoutés par puits et incubés à température ambiante pendant 30 min à l'abri de la lumière. La solution de calcéine a été ensuite aspirée et les cellules ont été rincées une fois par 500 μL par puits de PBS 1X. Ensuite, 200 μL par puits d'une solution de triton 1% ont été ajoutés sur les cellules et la plaque a été agitée sur l'agitateur de microplaques à température ambiante à l'abri de la lumière. Après 15 mn d'agitation, 100 μL par puits ont été récupérés et placés dans une plaque noire (96 puits), à fond transparent, pour la lecture de la fluorescence. Un blanc a été réalisé avec la solution de triton 1%. La fluorescence a été mesurée sur le spectrofluorimètre ($\lambda_{\text{émission}} = 530 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{excitation}} = 485 \text{ nm}$) et les résultats ont été exploités avec le logiciel Biolise.

3.3. Détection des cellules mortes par coloration au bleu de trypan

La coloration au bleu de trypan est une méthode de coloration des cellules mortes. Chez une cellule vivante, la membrane intacte empêche l'entrée du colorant dans le cytoplasme, alors qu'au contraire chez une cellule morte, la membrane lésée laisse passer le colorant ce qui aboutit à la coloration de la cellule en bleu.

Après 1 h d'incubation à 37°C en présence de B[a]P, de pyrène ou de phénanthrène les cellules ont été trypsinisées (100 μL par puits de trypsine à 0,05 %, Invitrogen, Ref : 25300-054) et centrifugées 5 min at 100 g. Le surnageant a été éliminé et les cellules ont été resuspendues dans le milieu sans sérum. Une partie de suspension de cellules a été diluée volume à volume avec la solution de bleu trypan 0,4% et incubée 3 min à température ambiante. Après 3 min, les cellules non colorées et colorées ont été comptées dans un hémacytomètre.

III. Analyse du taux d'expression

1. Expression protéique

1.1. Préparation de membranes totales de foie de souris

Un échantillon de foie d'environ 300 mg a été déposé dans un tube contenant un tampon STM 1,5 M (saccharose 85,58 g/L, Tris-HCl 788 mg/L, MgCl₂ 203,3 mg/L) à raison de 4 mL/g de tissu, puis broyé à l'aide d'un ultraturax® (Fischer Bioblock) à une vitesse de 500 rpm qui permet de séparer et de casser les cellules. Le mélange a ensuite été centrifugé une première fois à 800 x g durant 10 minutes afin de culoter les débris cellulaires. La pellicule grasseuse à la surface de l'échantillon a été délicatement écartée, puis le surnageant a été récupéré et déposé dans un autre tube. L'échantillon a été centrifugé à 1 500 x g durant 15 minutes dans le but de d'obtenir un culot renfermant les membranes totales. Le surnageant a été enlevé délicatement, puis 3 mL de tampon STM 1,5M ont été ajoutés afin de purifier les membranes totales après une autre centrifugation à 1 500 x g durant 15 minutes. A ce stade, le culot cellulaire renferme toutes les membranes d'un hépatocyte comprenant les membranes cellulaires ainsi que les membranes des organelles. Le surnageant a été écarté et le culot cellulaire contenant les membranes totales a été récupéré dans 1 mL d'un tampon de lavage (Tris-HCl 20 mM, EDTA 2 mM, pH ajusté à 7,4) puis conservé à -20°C.

1.2. Préparation des lysats cellulaires

Pour l'analyse par Western blot, les protéines cellulaires totales ont été extraites en utilisant un tampon RIPA. Les cellules en plaques 12 puits ont été lavées 2 fois avec du PBS froid puis placées sur glace. Pour la préparation des immunoblots, 300 µL d'un tampon RIPA (0,5M Tris-HCl, pH 7,4 contenant 1,5 M NaCl, 2,5% de l'acide désoxycholique 10% NP-40 et 10 mM d'EDTA; Millipore, Ref 20-188) supplémenté avec cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche, Ref : 11836145001; inhibition de protéases à sérine, cystéine, et métalloprotéases) et complété avec du fluorure de phénylméthylsulfonyle 10 mM (PMSF), de l'orthovanadate de sodium 100 mM (Na₃VO₄) ont été déposés dans chaque puits, et les lysats cellulaires ont été récupérés et incubés sur de la glace pendant 30 min puis centrifugés à 13 000 x g pendant 30 minutes à 4°C. La concentration en protéines a été déterminée en utilisant la méthode BCA.

1.3. Western blots

Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Les échantillons ont été dénaturés à 95°C pendant 5 min dans du tampon de Laemmli (4% SDS, 20% glycérol, 10% 2-mercaptoéthanol, 0,004% bleu de bromophénol et Tris-HCl 0,125 M, pH. 6,8 ; Sigma, ref S3401-10VL). Le gel d'une épaisseur de 1,5 mm a été préparé avec un gel de résolution de concentration en polyacrylamide comprise entre 8 et 12% (en fonction de la masse moléculaire de la protéine d'intérêt) dans un tampon contenant 1,5 M de Tris-HCl, pH 8,8 ; 0,01% (w/v) SDS, 0,01% de persulfate d'ammonium (APS) et de 0,04% de TEMED (N, N, N', N'-tétraméthyl-éthylènediamine). Le gel de concentration est un gel à 5% dans un tampon contenant 0,5 M de Tris-HCl, pH 6,8 ; 0,01% (w/v) de SDS, 0,01% d'APS et 0,1% de TEMED. Pour chaque transfert sur membrane avant le Western blot, la même quantité de protéines (15-30 µg) a été chargée dans chaque puits, en parallèle avec une aliquote de Precision Plus Protein™ (Bio-rad) en tant que marqueur de masse moléculaire. La migration des protéines par électrophorèse a été réalisée durant 15 min à 150 V dans un tampon de migration constitué de Tris-HCl 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0,1% pour la migration dans le gel de concentration, puis à 120 V pendant environ 90 min pour la migration dans le gel de résolution, puis les gels ont été transférés sur membrane de nitrocellulose (GE Healthcare) pendant 45 minutes à 350 mA dans un tampon de transfert (Tris-HCl 48 mM, Glycine 39 mM, SDS 0,0375%).

La qualité du transfert a été vérifiée à l'aide d'une solution de Rouge Ponceau (Sigma-Aldrich) et a permis de vérifier l'homogénéité du dépôt de protéines sur la membrane. Pour éliminer le colorant, les membranes ont été lavées avec un tampon TBST (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,15 M, et pH 7,4), les membranes ont été ensuite immédiatement incubées 1h avec une solution de saturation (tampon TBST contenant 5% (w/v) de lait) afin de saturer les sites non spécifiques de la membrane. Puis, les membranes ont été incubées avec l'anticorps primaire dans tampon TBST contenant 5% (w/v) de lait sous agitation lente (Tableau 7). Les membranes ont ensuite été lavées trois fois 5 min avec le tampon TBST puis incubées 1h avec l'anticorps secondaire couplé à la *horseradish peroxidase* (HRP-linked antibody) (Tableau 7). Suite à ces incubations, les membranes ont été lavées trois fois 5 min dans du TBST. Les bandes ont été détectées par chimioluminescence en utilisant le kit « *ECL-Western blotting* » (Amersham Biosciences) et en suivant les instructions du fournisseur et les images ont été capturées en utilisant le système

d'acquisition image de Fusion FX5 (Vilber Lourmat). La β -tubuline a été utilisée comme le *loading control* pour les lysats cellulaires (Tableau 7).

Les analyses densitométriques ont été réalisées en utilisant le logiciel ImageJ (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>).

Tableau 7: Description des anticorps utilisés et conditions de Western blot

Anticorps	Masse moléculaire apparente (kDa)	Conditions de blocage	Conditions d'incubation	Dilution utilisée	Fournisseur	Référence fournisseur
Anticorps primaires						
Anti-LSR (lapin)	56-68	5% lait dans TBST	3h à température ambiante ou une nuit à 4°C	1/1000	Sigma-Aldrich	HPA007270
Anti-LDL-R (lapin)	160	5% lait dans TBST	une nuit à 4°C	1/500	Abcam	ab30532
Anti-ACAT1	55	5% lait dans TBST	une nuit à 4°C	1/500	Santa Cruz Biotechnology	sc-161307
Anti-ACAT2	43	5% lait dans TBST	une nuit à 4°C	1/500	Santa Cruz Biotechnology	sc-30279
Anti-SRBI	75	5% lait dans TBST	une nuit à 4°C	1/500	Novus Biologicals	NB400-132
Anti-ABCG1	100	5% lait dans TBST	une nuit à 4°C	1/500	Novus Biologicals	NB400-104
Anti-ABCA1	254	5% lait dans TBST	une nuit à 4°C	1/1000	Millipore	MAB10005
Anti- β -tubuline (souris)	55	5% lait dans TBST	2h à la température ambiante	1/1000	Sigma-Aldrich	T5201
Anticorps secondaires						
<i>Anti-rabbit</i> IgG		5% lait dans TBST	1h à la température ambiante	1/2000	Cell Signaling	7074
<i>Anti-mouse</i> IgG		5% lait dans TBST	1h à la température ambiante	1/2000	Cell Signaling	7076
<i>Anti-goat</i> IgG		5% lait dans TBST	1h à la température ambiante	1/2000	Santa Cruz Biotechnology	sc-2922

1.4. Immunofluorescence

Après les traitements, les cellules ont été placées sur de la glace, lavées deux fois de suite avec un tampon PBS froid renfermant 0,2% (w/v) de BSA pendant 10 min, puis encore une fois avec le même tampon pendant 5 min et enfin deux fois avec du PBS froid seul. Les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde à 4% pendant 15 min à température ambiante, puis lavées de manière répétée (4 fois) avec du PBS froid. Le blocage a été effectué avec une solution de PBS/ BSA 10% (w/v) pendant 1 h. Il a été suivi par une incubation avec l'anticorps anti-LSR (dilution 1:200, Sigma-Aldrich) pendant 2 h à température ambiante. Les cellules ont ensuite été lavées trois fois pendant 5 min avec du PBS froid, puis une fois avec du PBS/BSA froid à 1% pendant 5 min avant l'incubation avec l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin (dilution 1:2000) conjugué à Alexa Fluor® 488 (A21206 ; Invitrogen Molecular Probes®) pendant 1 h à température ambiante. Après incubation, les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS pendant 5 min et les noyaux des cellules ont été colorés par incubation avec 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) (2 mg/mL; dilution 1:200) pendant 15 min à température ambiante. Après trois lavages de 5 min par du PBS froid, les lamelles ont été enlevées et montées sur des lames en utilisant le Fluoromount comme moyen de montage (F4680; Sigma-Aldrich). Après séchage pendant une nuit à 4°C, les cellules ont été observées au microscope confocal (Fluoview FV10i, Olympus) et photographiées. Les images ont été prises à partir d'au moins quatre régions différentes par lame renfermant presque le même nombre de cellules et analysées à l'aide du logiciel Wright Cell Imaging Facility (WCIF)-ImageJ (recherche du University Health Network, Canada; <http://www.uhnres.utoronto.ca/facilities/wcif/index.htm>).

2. Expression au niveau de l'ARNm

2.1. Extraction des ARNm

2.1.1. A partir de cellules Hepa1-6

Pour l'extraction de l'ARNm, les cellules ont été raclées dans 350 µL de tampon de lyse RLT (Qiagen) contenant du β-mercaptoéthanol (10 µL/mL de tampon de lyse) et les lysats cellulaires ont été stockés à -20°C. L'ARN total a été extrait à partir de cellules Hepa1-6 à l'aide du RNeasy Mini Kit (Qiagen) selon les instructions du fournisseur. Les lysats cellulaires ont été agités au vortex pendant 30s de façon à dissocier les cellules et ensuite déposés sur des colonnes d'ADNg pour éliminer l'ADN génomique par centrifugation à 8000 x g pendant 30 s.

L'ADN génomique reste fixé à la membrane de la colonne tandis que la solution contenant de l'ARN traverse la colonne et est appelé « *flow-through* ». Un volume de 350 µL d'éthanol à 70% a été ajouté au *flow-through* et transféré sur une colonne RNeasy, suivie d'une centrifugation à 8000 x g pendant 15 s. La membrane de la colonne ensuite été lavée une fois avec 700 µL de RW1 (composition non précisée par le fournisseur) et deux fois avec 500 µL de tampon RPE (composition non fournie) par centrifugation à 8000 x g pendant 15 s. Une centrifugation supplémentaire a été effectuée à 13 000 x g pendant 2 minutes pour sécher la membrane de la colonne et l'ARN total a été élué dans 60 µL d'eau RNase-free.

2.1.2. A partir de foies

Des échantillons de foies congelés (poids compris entre 30 et 40 mg) ont été homogénéisés dans 1 mL de tampon de lyse (QIAzol Lysis Reagent, Qiagen) en utilisant un ultraturax. La sonde de l'ultraturax, stockée dans du NaOH 2M, a été rincée deux fois dans l'éthanol 70%, puis deux fois dans de l'eau ultrapure avant le broyage de chaque échantillon de tissu. Les fragments de tissus ont été mélangés dans la solution de lyse jusqu'à ce qu'une homogénéisation complète soit obtenue.

L'ARN total a été extrait à partir des foies à l'aide de la RNeasy® lipid tissue Mini Kit de tissu de lipide (Qiagen). Les échantillons homogénéisés ont été placés à température ambiante pendant 5 min, puis agités au vortex vigoureusement pendant 15 s après addition de 200 µL de chloroforme. Après 2-3 min à température ambiante, les homogénats ont été centrifugés à 12 000 x g pendant 15 min à 4°C, ce qui entraîne la séparation des échantillons en trois phases: une phase aqueuse supérieure contenant l'ARN incolore, d'une interface blanche contenant de l'ADN et une phase organique inférieure rouge contenant les protéines.

Après avoir transféré la phase aqueuse supérieure dans un tube propre, 600 µL d'éthanol à 70% ont été ajoutés et l'échantillon a été chargé sur une colonne RNeasy Mini, puis centrifugé à 8000 x g pendant 15 s à température ambiante. La colonne a été lavée une fois avec 700 µL de RW1 et une fois avec 500 µL RPE par centrifugation à 8000 x g pendant 15s. La colonne a été finalement lavée à nouveau avec 500 µL RPE par centrifugation à 8000 x g pendant 2 min. Une centrifugation supplémentaire a été réalisée à 13000 x g pendant 1 min de façon à sécher la membrane de la colonne et l'ARN total a été élué dans 60 µL d'eau de qualité RNase-free.

2.2. Quantification des ARN totaux

La concentration d'ARN total a été déterminée à 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf) tandis que la pureté de l'ARN a été estimée en calculant le rapport 260/280 nm (les protéines absorbant fortement vers 280 nm); les échantillons ayant un rapport > à 1,7 ont été utilisés pour les analyses ultérieures.

2.3. Transcription inverse (RT)

Dix microgrammes d'ARN totaux obtenus après extraction ont été utilisés pour synthétiser l'ADNc dans un volume final de 50 µL. Dans un mélange réactionnel contenant des hexamères aléatoires (50 ng/µL) et des désoxynucléotides triphosphates (dNTP, 0,5 mM), l'ARN a été dénaturé pendant 5 min à 65°C et ensuite placé sur de la glace pendant 1 min. Le mélange a été complété à 25 µL avec du tampon RT renfermant 5 mM de MgCl₂, 10 mM de dithiothréitol, 2 U/µL de RNaseOUT™ (inhibiteur de RNAses) et 2 U/µL de *reverse transcriptase* SuperScript™ II. Il a été incubé à 42°C pendant 5 min, puis à 50°C pendant 50 min, suivi d'une incubation finale à 70°C pendant 15 min. L'ADNc obtenu a été aliquoté et stocké à -80 ° C. Tous les réactifs utilisés dans ces réactions ont été obtenus auprès d'Invitrogen.

2.4. Real-time qPCR

La PCR quantitative a été effectuée dans un système PCR en temps réel, StepOnePlus™ (Applied Biosystems), avec 500 ng d'ADNc en utilisant le powerSYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) pour *lsr* et *ldl-r* et le TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) pour *abca1* (Mm00442646_m1).

Les oligonucléotides utilisés sont présentés dans le Tableau 8. Après la transcription inverse, les échantillons d'ADNc ont été dilués 20 fois afin d'éviter l'inhibition par le mélange de réaction RT et 5 µL des échantillons ont été ajoutés dans chaque puits contenant 20µL de Master Mix. Le gène de l'Hypoxanthine guanine PhosphoRibosylTransférase (*hprt*) a été utilisé comme gène de référence. Les calculs d'expression relative et les analyses statistiques ont été effectués en utilisant l'outil «*Relative Expression Software Tool*» (REST, 2009).

Tableau 8: Primers spécifiques utilisés pour la PCR quantitative

Gene	Primer	Séquence (5'-3')	Localisation	Taille Amplicon (bp)
lsr	Forward	CAGGAGAATCACCATCACAGGAA	Exon 2	77
	Reverse	AGTAATACTACTCCACTGTCTCCCCAG	Exon 3	
lsrα	Forward	AAGATCTGGATGGGAACAACGAG	Exon 3	63
	Reverse	CTTCTGAGGTCCTGCCAAGG	Exon 4	
lsrα'	Forward	AAGATCTGGATGGGAACAACGAG	Exon 3	60
	Reverse	CAAAGAGCCAATCAAGGACAATG	Exon 5	
lsrβ	Forward	AAGATCTGGATGGGAACAACGAG	Exon 3	61
	Reverse	CCAGCAGCATAAACAAGGACAAT	Exon 6	
ldl-r	Forward	CTGGTGACCGAAAACATCCAGT	Exon 11	76
	Reverse	AATCAACCCAATAGAGACGGCC	Exon 12	
abca1	Forward/ Reverse	Mm00442646_m1 (séquence non précisée par le fournisseur)	-	-
hprt	Forward	TCAGACTGAAGAGCTACTGTAATGATCA	Exon 3	76
	Reverse	AAAGTTGAGAGATCATCTCCACCAA	Exon 4	

Hprt: hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase

IV. Etude de l'activité

1. Purification des lipoprotéines à partir de sérum

1.1. Purification des VLDL

Les plasmas préparés à partir de sang humain ont été centrifugés dans des tubes Beckman en polycarbonate à paroi épaisse à 4°C et 228 850 x g (70,000 rpm) pendant la nuit (minimum 12h) dans une ultracentrifugeuse Optima équipée d'un rotor Beckman MLA-80 à angle fixe (valeurs d'accélération et de décélération réglées sur 9). Après 12h, la couche supérieure contenant les VLDL ($d < 1,006$ g/mL) a été retirée délicatement avec une seringue et une aiguille courbe, placée dans un nouveau tube auquel a été ajouté 0,3 volume d'une solution renfermant 0,15 M NaCl et 0,24 mM EDTA, pH 7,4 (lavage des VLDL). Après une nouvelle centrifugation (mêmes conditions que précédemment), les VLDL ont été filtrées sur filtre de 0,45 μ m et étaient d'apparence jaune et translucide. La concentration en protéines a été déterminée par la méthode modifiée de Lowry.

1.2. Purification des LDL

Pour la purification des LDL à partir de plasma humain, 2,518 g NaBr ont été ajoutés à 100 mL de plasma pour obtenir une densité finale de 1,025 g/mL. Puis le plasma a été centrifugé dans des tubes Beckman en polycarbonate à paroi épaisse à 4°C et 228 850 x g (70 000 rpm) pendant la nuit (minimum 12 h) dans une ultracentrifugeuse Optima équipée d'un rotor Beckman MLA-80 à angle fixe (valeurs d'accélération et de décélération réglées sur 9). Après 12 h, la couche supérieure (d : 1,006 à 1,025 g/mL) contenant les VLDL et les IDL est retirée à l'aide d'une seringue à aiguille recourbée, et la fraction inférieure (d > 1,025 g/mL), contenant entre-autres les LDL, a été récupérée et ajustée à une densité d = 1,055 g/mL en ajoutant 4.036 g NaBr/100 mL. Puis cette fraction a été centrifugée dans des tubes en polycarbonate Beckman à paroi épaisse à 4°C et 228 850 x g (70 000 rpm) pendant 20 h en utilisant le même rotor. Après 20 h, la fraction de supérieure (d : 1,025 à 1,055) contenant les LDL a été isolée à l'aide d'une seringue à aiguille courbe. Pour laver et concentrer cette fraction LDL, 5,132 g NaBr ont été ajoutés pour 100 mL de fraction collectée, puis une nouvelle centrifugation a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. Après 20 h, les LDL concentrées ont été récupérées avec une spatule (si un gel s'était formé) ou une pipette Pasteur, et la fraction LDL a été dialysée à 4°C à l'obscurité contre 1 L de solution renfermant 0,15 M de NaCl et 0,24 mM d'EDTA à pH 7,4, cette solution de dialyse étant renouvelée 3-4 fois sur une période de 24 h.

2. Immunofluorescence

2.1. Préparation de LPDS

Un sérum exempt de lipoprotéines (*lipoprotein-deficient serum*, LPDS) a été préparé (d : 1,25 g/mL) en ajoutant 35,82 g NaBr/100 mL à un pool de plasma humain frais suivi d'une centrifugation à 4°C et 228 850 x g pendant 24 h. La couche supérieure contenant les lipoprotéines (VLDL, LDL et HDL) a été écartée, alors que la fraction inférieure a été recueillie et dialysée à 4°C contre 1 L de tampon A (0,15 M de NaCl, 0,24 mM EDTA à pH 7,4) en utilisant une membrane de dialyse Spectra/Por® de seuil de coupure égal à 3500 Da (Spectrum laboratories), passée sur un filtre de 0,2 µm (Acrodisc ® Filtres-Pall Corporation seringues), aliquotée et stockée à -20 ° C.

2.2. Marquage fluorescent des LDL

Les LDL ont été marquées en utilisant un colorant lipophile, le Dil (1,1'-dioctadécyl-3, 3,3', 3'-tetraméthylindocarbocyanine perchlorate), qui est utilisé pour marquer le noyau lipidique neutre des lipoprotéines. Ce test a été utilisé pour déterminer l'activité des récepteurs de lipoprotéines, LDL-R (Stephan and Yurachek, 1993) et LSR (Yen *et al.*, 2008). La solution stock de Dil a été préparée par dissolution de 3 mg de Dil (Sigma-Aldrich) dans 1 mL de DMSO. Le marquage a été réalisé en incubant 10 mg de LDL avec 500 µL de Dil (50 µL/mg de protéine de LDL) et 20 mL de LPDS pendant 2 h à 37°C. Le LPDS a été utilisé comme une source de protéine de transfert de lipides, *i.e.* de *cholesteryl ester transfer protein*, ce qui facilite l'incorporation de Dil dans les lipoprotéines. La densité des Dil-LDL a été ajustée à 1,063 g/mL par addition de 7,698 g NaBr/100 mL, puis une centrifugation à 228 850 x g a été réalisée pendant 24 h à 4°C. La couche supérieure contenant les Dil-LDL a été placée en dialyse à 4°C contre 1 L de tampon A (0,15 M de NaCl contenant 0,24 mM d'EDTA, pH 7,4 en utilisant une membrane de dialyse Spectra/Por® avec un seuil de coupure de 3500 Da, à 4°C et à l'obscurité). Le tampon de dialyse a été changé 4 fois sur une période de 24 h. Après dialyse, les Dil-LDL ont été filtrées (0,2 µm) et utilisées immédiatement. La teneur en protéines a été mesurée par la méthode modifiée de Lowry.

2.3. Modification des LDL par la cyclohexanedione

La capacité des LDL à se lier au LDL-R a été supprimée par modification des résidus arginine des apolipoprotéines ApoB par la cyclohexanedione (CHD; Sigma-Aldrich). Pour cela, 5 mg de Dil-LDL ont été dilués dans 1 mL de tampon A, avec une incubation ultérieure dans 2 mL de CHD 0,15 M en solution dans du borate de sodium 0,2M (pH 8,1) à 37°C pendant 2h à l'obscurité (Shepherd and Packard, 1986). Les Dil-LDL modifiées par la CHD ont ensuite été dessalées sur une colonne PD10 (GE Healthcare) pour enlever l'excès de CHD. La colonne a été lavée dans du tampon A, et l'élution a été également effectuée en utilisant le tampon A. Les différentes fractions de Dil-LDL modifiées par la CHD ont été prélevées et la concentration en protéine a été mesurée par la méthode modifiée de Lowry.

2.4. Fixation des LDL marquées au LSR

Les cellules Hep1-6 ont été étalées à raison de 50 000 cellules/puits dans des plaques à 24 puits à couvercles. Après 48h d'incubation à 37°C, les cellules ont été lavées deux fois avec du

PBS 1X et le milieu a été remplacé par 500 µL/puits de milieu DMEM fraîchement préparé, stérilisé par filtration (0,45 µm; Acrodisc®-filtres Pall Corporation seringues) et renfermant 5 mM de HEPES, 0,2% (w/v) de BSA (pH 7,5) et 3,7 g/L de NaHCO₃. Les études de fixation ont été réalisées en incubant les cellules Hepa1-6 d'abord avec de l'oléate (en solution dans l'isopropanol, concentration finale : 0,5 ou 0,8 mM) pendant 3 minutes à température ambiante afin de permettre l'activation du LSR. Les cellules ont ensuite été incubées avec 5 µg/mL ou 10 µg/mL avec les Dil-LDL modifiées par la CHD pendant 1 h à 37°C. Les puits sans oléate ont également été inclus comme témoins avec la même quantité d'isopropanol (1% en concentration finale). L'expérience a été réalisée avec deux préparations différentes de cellules.

Après les traitements, les cellules ont été placées sur de la glace, lavées deux fois de suite avec un tampon PBS/BSA 0.2% (w/v) froid pendant 10 min, puis encore une fois pendant 5 min, suivie de deux lavages successifs avec du PBS froid seul. Les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde à 4% pendant 15 min à température ambiante, puis lavées de manière répétée (4 fois) avec du PBS. Le blocage a été effectué avec une solution de PBS/BSA 10% (w/v) pendant 1 h, suivi par une incubation avec un anticorps anti-LSR (1:200 de dilution, Sigma-Aldrich) pendant 2 h à température ambiante. Les cellules ont ensuite été lavées trois fois 5 min avec du PBS, puis une fois avec du PBS /BSA à 1% pendant 5 min avant l'incubation avec un anticorps secondaire anti-IgG de lapin (1:2000 dilution) conjugué à Alexa Fluor® 488 (A21206 ; Invitrogen Molecular Probes®) pendant 1 h à température ambiante. Après incubation, les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS pendant 5 min et les noyaux des cellules ont été colorés par incubation avec du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) (2 mg/mL; dilution 1:200) pendant 15 min à température ambiante. Après trois lavages avec du PBS pendant 5 min, les lamelles ont été enlevées et montées sur des lames en utilisant Fluoromount comme moyen de montage (F4680; Sigma-Aldrich). Après séchage pendant une nuit à 4°C, les cellules ont été observées au microscope confocal (Fluoview FV10i, Olympus) et photographiées. Les images ont été prises sur au moins quatre domaines différents par lame avec presque le même nombre de cellules par domaine, et analysées à l'aide du logiciel *ImageJ-Wright Cell Imaging Facility* (WCIF) (<http://www.uhnres.utoronto.ca/facilities/wcif/index.htm>).

2.5. Effet du B[a]P sur l'interaction entre les Dil-LDL modifiées

Les Dil-LDL modifiées par la CHD ont été incubées à température ambiante pendant 30 min en absence ou en présence de B[a]P (1 μ M). Les expériences de fixation des LDL modifiées sur le LSR exprimé en surface des cellules ont été conduites dans les conditions expérimentales présentées dans le paragraphe IV.2.4, mais les cellules ont été incubées avec de l'oléate (concentration finale 0,8 mM) et 5 μ g/mL de LDL marquées au DiI et modifiées par la CHD et ensuite préincubées avec le B[a]P. Les étapes suivantes sont également précisées dans le paragraphe IV.2.4).

3. Préparation de protéines de membranes plasmiques hépatiques enrichies en LSR

Des foies de rats âgés de 9 à 12 semaines, ont été utilisés pour la préparation d'un extrait enrichi en LSR suivant le protocole développé par Mann *et al.* (1995). Soixante-treize rats (rats Sprague-Dawley, poids moyen 350 g) ont été anesthésiés par injection de 0,5 à 0,8 mL de pentobarbital de sodium (référence 57-33-0, Sigma-Aldrich). Les cavités de l'abdomen ont été ouvertes et les foies ont été perfusés par la veine porte avec un tampon HEPES (5 mM, pH 7,4) glacé, contenant 0,15 M NaCl et 2 mM d'EDTA (tampon de perfusion). Le débit était de 0,5 mL/min, ce qui est proche de la vitesse d'écoulement du sang *in vivo* (0,35 mL/min/g de foie). Les foies ont été incisés et rincés 2 fois dans le tampon de perfusion, puis essuyés et passés 2 fois à l'homogénéisateur dans un tampon contenant 0,25 M de saccharose, 5 mM de Tris-HCl and 1 mM de MgCl₂, pH 7,4 (STM 0,25 M) à 500 x g pendant 5 min à température ambiante (Yamato, homogénéisateur LSC). Un cocktail d'inhibiteurs de protéases (dilution au 1/100ème, *complete cocktail inhibitor tablets*; Roche Molecular Biochemicals, ref: 11836145001, préparé selon les indications du fournisseur) et du PMSF (dilution au 1/100ème) ont été ajoutés le jour de la préparation au tampon STM 0,25 M. L'homogénat a été centrifugé (280 x g, 4 °C, 10 min) pour éliminer les débris cellulaires et les noyaux des cellules. Le surnageant a été transféré dans un tube conique de 50 mL et centrifugé à nouveau (1500 x g, 4°C, 15 min). La couche lipidique blanche a été retirée délicatement de la surface et le culot a été remis dans le tampon STM 0,25 M pour atteindre un volume final de 10 mL, et homogénéisé deux fois à 500 x g. Un volume de 21,7 mL de STM 2 M (même composition que le tampon STM 0,25 M excepté que la concentration de saccharose est de 2 M) a été ajouté dans chaque tube et la densité a été contrôlée (1,18 g/mL). Le volume a été ajusté à 34 mL dans chaque tube avec du tampon STM 1,42 M. Ce mélange a été transféré dans un tube SW28 Ultra-Clear et 3 mL de tampon STM 0,25 M ont été ajoutés délicatement sur le dessus des tubes. Les tubes ont été centrifugés dans

un rotor SW28 Beckman (82000 g, 60 min, 4°C). La membrane plasmique à l'interface a été recueillie et reprise dans un tampon Tris-HCl 20 mM, EDTA 2 mM, pH 7,4 (tampon de lavage), puis centrifugée (1500 x g, 15 min, 15°C). Le culot a été à nouveau repris dans un tampon de lavage contenant le cocktail d'inhibiteurs (dilution au 1/100^{ème}) et traité par ultrasons (puissance 2,5, cycle 25%, 30 s; Vibra Cell). La concentration des protéines a été déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Des aliquotes de membranes plasmiques (40 mg de protéines) ont été réparties dans des tubes et centrifugées dans le rotor Beckman Ti75 (120 000 x g, 20 min, 4°C). Le surnageant a été éliminé et le culot a été remis en suspension dans 5 mL de tampon CHAPS (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 13 mM CHAPS pH 8,0), et le cocktail d'inhibiteurs de protéases (dilution au 1/100^{ème} : 10 mL/L). Les fractions aliquotes ont été traitées par les ultrasons (puissance 2,5, cycle 25%, 30s) et incubées à 4°C pendant 30 min, puis centrifugées (200 000 x g, 4 °C, 2h). Le surnageant contenant les protéines a été filtré sur un filtre de 0,22 µm et utilisé pour les *ligand blots*.

4. Interaction entre les lipoprotéines (VLDL et LDL) et les récepteurs LSR et LDL-R par la technique du *Ligand blot*

4.1. Traitement des VLDL et LDL

Les VLDL et les LDL préparées comme indiqué dans les paragraphes IV.1.1 et IV.1.2 ont été pré-incubées à température ambiante pendant 30 min en absence ou en présence de B[a]P (1 ou 5 µM). Les tampons d'incubation utilisés étaient un tampon PBS additionné de 200 mM NaCl (concentration finale en NaCl: 350 mM) et 2 mM d'EDTA, pH 8 pour les études de fixation des lipoprotéines sur le LSR, et du tampon Tris-HCl, 50 mM pH 8, contenant 2 mM de CaCl₂, 50 mg/mL de BSA et 90 mM de NaCl pour les études d'interaction des lipoprotéines avec le LDL-R.

4.2. Ligand blot

Une quantité de 30 µg de protéines de membranes plasmiques hépatiques de rat enrichies en LSR et LDL-R a été déposée sur un SDS-PAGE à 10% d'acrylamide, en conditions non réductrices et transférée après migration sur membrane de nitrocellulose. La quantité de protéine déposée a été systématiquement vérifiée à l'aide d'une coloration au Rouge Ponceau. Les bandelettes de nitrocellulose ont été placées pendant 1 h dans un tampon PBS contenant 3% de BSA pour bloquer les sites de fixation non spécifiques. Après quatre lavages de 10 min dans le tampon PBS, les bandelettes préparés pour le LSR ont été incubées 15 min dans un

tampon PBS additionné de 200 mM NaCl (concentration finale en NaCl: 350 mM) et 2 mM d'EDTA, pH 8, puis 15 min en présence 0,8 mM d'oléate dans le même tampon. Pour le LDL-R, le tampon utilisé était du Tris-HCl, 50 mM pH 8, contenant 2 mM de CaCl₂, 50 mg/mL de BSA et 90 mM de NaCl (Daniel *et al.*, 1983) et sans oléate, car la liaison de LDL-R à son ligand est dépendante de Ca²⁺, et ne nécessite pas une activation par les acides gras, à la différence de la liaison des lipoprotéines au LSR. Les bandelettes ont été ensuite incubées pendant 1 h à 37°C avec 20 µg/mL de B[a]P-VLDL (VLDL préincubées avec le B[a]P) ou de B[a]P-LDL (LDL préincubées avec le B[a]P). Après quatre lavages de 15 min dans le tampon PBS contenant 0,5 % de Triton X-100 pour le LSR ou 50 mM Tris-HCl, pH 8 contenant 2 mM CaCl₂, 5 mg/mL de BSA and 90 mM NaCl pour le LDL-R, les bandelettes ont été incubées avec de l'anticorps anti-ApoB ou anti-ApoE (dilution au 1/500, Santa Cruz Biotechnology) pendant 3h à 37 °C afin de détecter les VLDL (apoB ou apoE) et LDL (apoB) fixées sur la membrane de nitrocellulose. Après trois lavages de 15 min dans le tampon TBST, les membranes de nitrocellulose ont été incubées avec un anticorps secondaire conjugué à la HRP (1/2000). La révélation a été effectuée comme précédemment.

V. Diffusion dynamique de la lumière et mesure du potentiel Zeta

Les mesures ont été réalisées en collaboration avec Jordane Janiewski (LIBIO, UL) sur un Zetasizer Nano ZS (Malvern, Angleterre) équipé avec un laser DPSS double fréquence à 532 nm, une cellule de mesure, un photomultiplicateur et un corrélateur. L'intensité diffusée a été mesurée avec un angle de 173° par rapport à la source par une avalanche de détecteurs photodiodes. Le logiciel utilisé pour collecter et analyser les données est le logiciel Zetasizer version 6.34 (Malvern).

Un mL de LDL ou de LDL (indice de réfraction : 1,47) à une concentration de 20 µg/mL dans du Tris-HCl 0,2 mM (pH 7.4) a été placé dans une cellule Zeta (DTS1060 Malvern). Les mesures ont été réalisées à respectivement 5,50 et 2 mm de la paroi de la cuve pour le DLS et pour le potentiel zeta, avec un atténuateur automatique, à une température contrôlée de 25°C. Ces réglages particuliers ont permis de réduire considérablement les bruits de fond et de travailler dans un milieu légèrement trouble. Les fonctions d'autocorrélation en intensité ont été analysées par l'algorithme CONTIN afin de déterminer la distribution du coefficient de diffusion translationnelle en z moyen des particules, D_T (m². s⁻¹). Le paramètre DT est relié au rayon hydrodynamique (R_h) des particules par la relation de Stokes-Einstein:

$$D_T = k_B T / 6\pi\eta R_h$$

où η est la viscosité du solvant (Pa.s) ; k_B , la constante de Boltzmann (1.38×10^{-23} N.m.K⁻¹) ; T , la température absolue (K) et R_h (m), le rayon hydrodynamique d'une sphère qui aurait le même coefficient de diffusion que la particule (Gaylord and Gibbs, 1962).

Pour chaque échantillon, 15 runs de 70 s ont été réalisés avec 3 répétitions. La détermination du potentiel Zeta approximé a été obtenue à partir des mesures de mobilité électrophorétique déterminées avec une sélection automatique du voltage, en appliquant l'équation de Smoluchowski. Pour chaque échantillon, 20 runs ont été réalisés avec 3 répétitions.

VI. Dosage de B[a]P et de ses métabolites dans les échantillons de sérum des souris

Ces analyses ont été réalisées par Nathalie Grova au *Laboratory of Analytical Human Biomonitoring*, CRP-Santé, Luxembourg, 1511, Luxembourg. Des échantillons (100 μ L de sérum) ont été additionnés de 20 μ L du 1-OH-benz[a]anthracene-¹³C₆ (1 mg/mL) et de 10 μ L de B[a]P-*d*₁₂ (1 mg/mL) comme étalons internes et ajustés à pH 5,7 avec 200 μ L de tampon acétate de sodium 1 M. Les procédures d'hydrolyse, d'extraction et de purification ont été effectuées conformément à la méthode d'analyse décrite récemment par Peiffer (Peiffer *et al.*, 2013). Des extraits de plasma ont été reconstitués dans 25 μ L de MSTFA (N-méthyl-N-(triméthylsilyl) trifluoroacétamide, Sigma-Aldrich). La dérivatisation des analytes cibles était complète en 30 min à 60°C, et 2 μ L de l'extrait ont été injectés dans le système GC-MS/MS. Les analyses ont été effectuées avec un chromatographe en phase gazeuse Agilent 7890A équipé d'une colonne capillaire HP-5MS (30 m, diamètre interne : 0,25 mm, épaisseur de film : 0,25 μ m), couplé à un spectromètre de masse triple quadripôle Agilent 7000A fonctionnant en mode d'ionisation par impact d'électrons et d'un passeur d'échantillons Agilent CTC PAL. Les conditions d'analyses utilisées pour la chromatographie et la détection MS/MS ont été décrits comme précédemment (Grova *et al.*, 2011). Des courbes d'étalonnage ont été effectuées en utilisant des échantillons de plasma supplémentés avec des concentrations croissantes de B[a]P et de leurs métabolites de 0 à 125 ng/mL de plasma. Les limites de quantification (LQs) ont été évaluées à 0,25 ng/mL de plasma pour le B[a]P, et variaient de 0,1 à 1,0 ng/mL pour les formes monohydroxylées et dihydroxylées du B[a]P.

VII. ANALYSES STATISTIQUES

Tous les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM, sauf indication contraire. Les différences statistiques ont été testées en utilisant le test t de Student ; La différence est considérée comme significative lorsque $p < 0,05$. Des corrélations ont été évaluées à l'aide du coefficient de corrélation de Pearson ou de Spearman.

- Corrélation de Pearson :

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

\bar{x} est la moyenne de x, et

\bar{y} la moyenne de y.

La corrélation de Pearson fonctionne bien avec des données qui suivent une distribution normale.

- Coefficient de corrélation de Spearman :

$$\rho = \frac{n(\sum x_i y_i) - (\sum x_i)(\sum y_i)}{\sqrt{n(\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2} \sqrt{n(\sum y_i^2) - (\sum y_i)^2}}$$

Ce coefficient est non paramétrique car il ne fait aucune supposition sur une distribution sous-jacente.

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 1

Cette étude étant la première de ce type réalisée au sein de notre équipe, des essais préliminaires ont été nécessaires pour trouver un HAP qui exerçant un effet sur certains acteurs du métabolisme lipidiques (LSR, LDL-R, ABCA1) et définir les doses adaptées à des études cellulaires.

I. Effets des micropolluants sur la viabilité des cellules

Avant de débiter les expériences consacrées à l'effet des micropolluants sur le métabolisme lipidique des cellules Hepa 1-6, il était nécessaire de rechercher les concentrations de micropolluants qui ne soient pas toxiques pour les cellules. Pour tous les tests de viabilité, les cellules ont été cultivées dans du DMEM etensemencées dans des plaques à 24 puits, comme décrit dans Matériels et Méthodes. Quarante-huit heures après ensemencement, les cellules ont été lavées avec du PBS 1X et le milieu a été renouvelé. Les cellules ont ensuite été incubées avec différentes concentrations de 3 HAP, le B[a]P, le pyrène et le phénanthrène, soient 0,1 ; 1, 10 ; 100 et 1000 μ M pendant 1 h.

1.1. L'activité mitochondriale : test MTT

Le test MTT est un test qui permet de déterminer l'activité mitochondriale et qui reflète donc l'activité métabolique cellulaire globale (Mosmann, 1983; van Meerloo *et al.*, 2011). Les résultats de ce test ont montré que le B[a]P n'avait pas d'effet cytotoxique aux concentrations testées. Cependant, le B[a]P augmente de manière significative (+18 %) l'activité mitochondriale à la concentration la plus élevée (1 mM) par rapport au contrôle traité avec du DMSO seul (**Figure 16**). A l'inverse, le pyrène à des concentrations 10, 100 et 1000 μ M respectivement diminue de 11, 16 et 23% l'activité mitochondriale des cellules Hepa1-6. De même, le phénanthrène à des concentrations de 10, 100 et 1000 μ M diminue respectivement l'activité mitochondriale des cellules Hepa1-6 de 8, 14 et 23%.

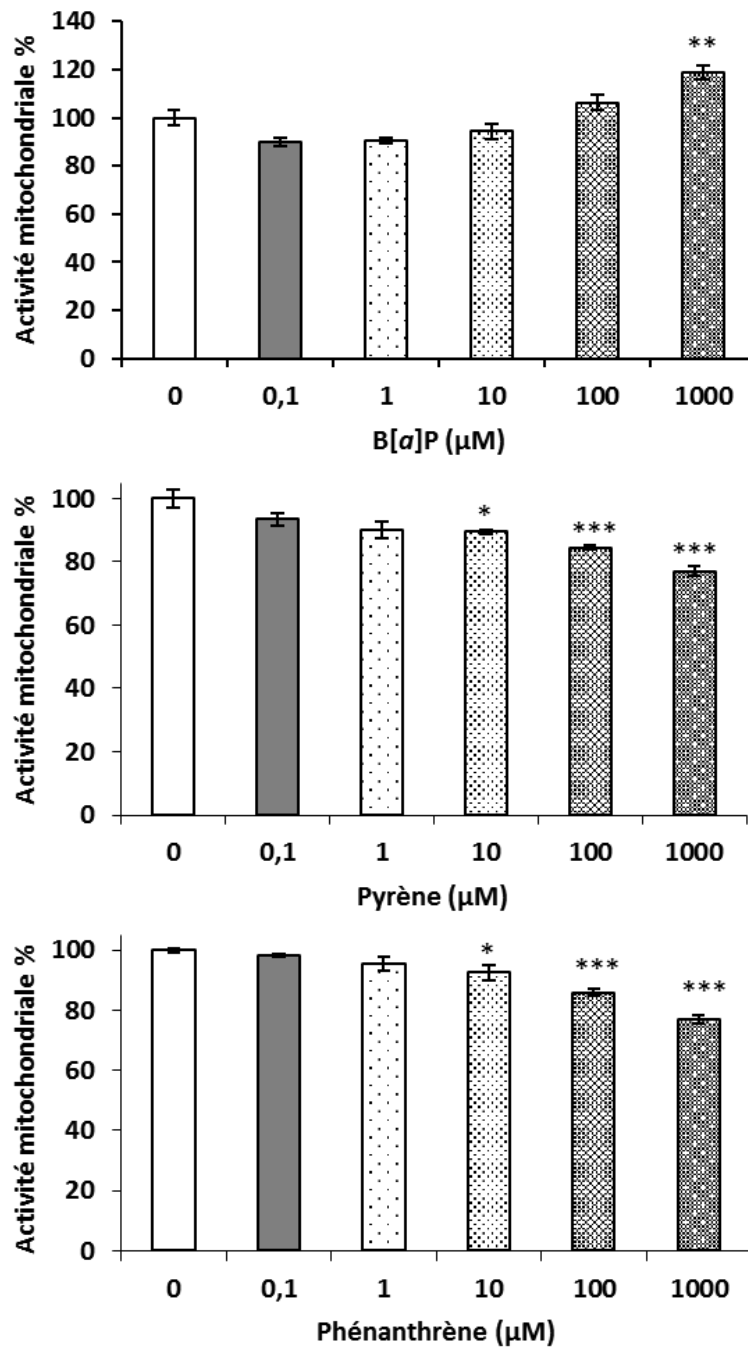


Figure 16: Effets du traitement par le B[a]P, le pyrène et le phénanthrène sur la viabilité des cellules Hepa 1-6 (test au MTT)

Les cellules ont été incubées avec les concentrations indiquées de B[a]P, de pyrène et de phénanthrène (solution mère préparée dans du DMSO) pendant 1h et la survie des cellules a été évaluée en mesurant l'activité de réduction du MTT. Les cellules témoins ont été traitées avec le DMSO seul et leurs valeurs d'absorbance ont été normalisées à 100%. Les résultats sont représentés en tant que moyenne \pm SEM (déterminations en quadruple) et les valeurs de p sont indiquées lorsqu'elles sont significatives par rapport aux contrôles, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

1.2. Calcéine

Dans la même logique, la viabilité des cellules Hepa1-6 a été déterminée en utilisant un test à la calcéine qui permet d'estimer la viabilité des cellules *via* l'activité estérasique des cellules vivantes. La survie cellulaire a été mesurée en utilisant l'essai de réduction de la calcéine (comme décrit dans Matériels et Méthodes).

Les résultats du test calcéine ont montré que le B[a]P n'avait pas d'effet cytotoxique à des concentrations inférieures à 1 mM. Cependant, la concentration la plus élevée de B[a]P (1 mM) a augmenté de 20% la viabilité des cellules par rapport au contrôle, traité avec du DMSO (**Figure 17**). A l'inverse, le pyrène à des concentrations 10, 100 et 1000 μ M a diminué respectivement de 12, 15 et 23% la viabilité des cellules Hepa1-6. De même, le phénanthrène à des concentrations 10, 100 et 1000 μ M a diminué respectivement de 11, 14 et 22% la viabilité des cellules Hepa1-6.

1.3. Coloration au bleu de trypan

Nous avons également déterminé la viabilité des cellules exposées au B[a]P, au pyrène et au phénanthrène par coloration au bleu de trypan, qui est une méthode de coloration des cellules mortes.

Les résultats du test coloration au bleu de trypan ont montré que le B[a]P n'avait pas d'effet cytotoxique à des concentrations ≤ 1 μ M. Cependant, le B[a]P a diminué de manière significative la viabilité cellulaire (11%, 18% et 24% respectivement pour des concentrations 10, 100 et 1000 μ M), par rapport au contrôle (**Figure 18**). De même, le pyrène a diminué de manière significative la viabilité cellulaire des cellules Hepa1-6 (de 8, 17 et 23% respectivement pour des concentrations de 10, 100 et 1000 μ M). Le phénanthrène a diminué également de manière significative la viabilité cellulaire des cellules Hepa1-6 (9, 15 et 23% respectivement pour des concentrations de 10, 100 et 1000 μ M).

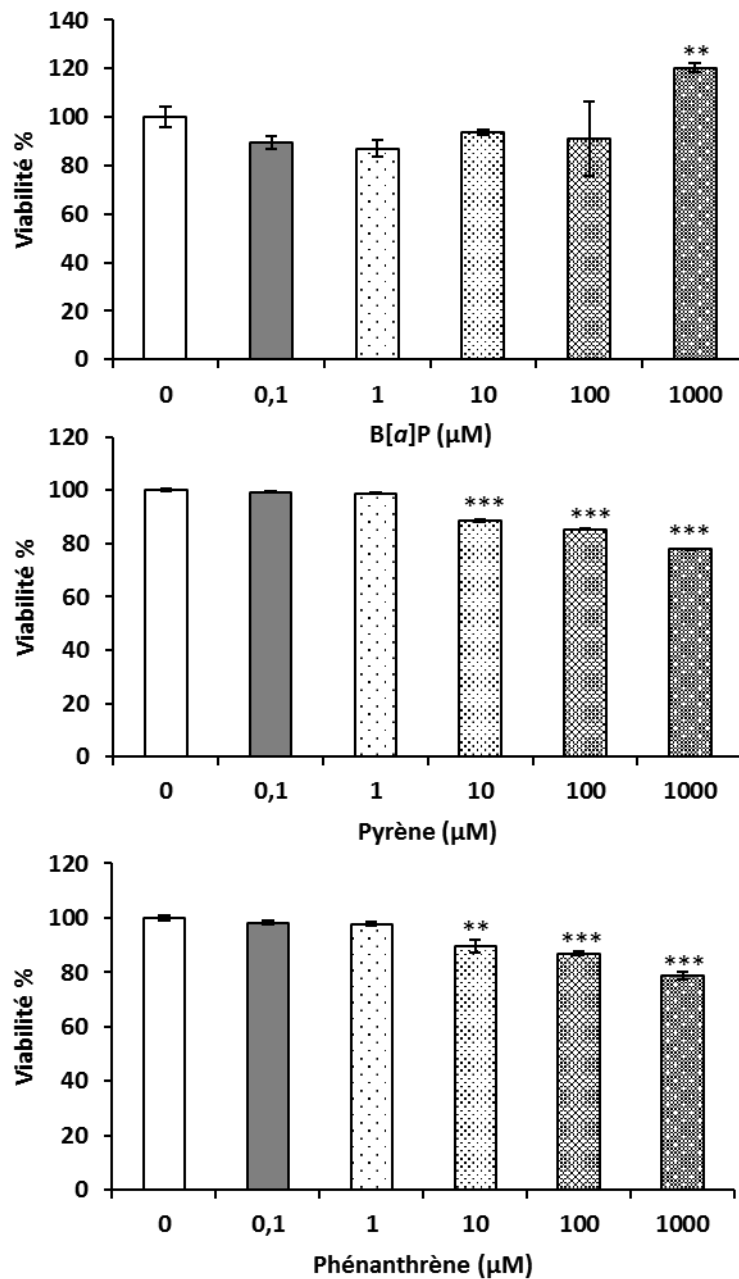


Figure 17: Effets du B[a]P, du pyrène et du phénanthrène sur la viabilité des cellules Hepa I-6 (test à la calcéine).

Les cellules ont été incubées avec les concentrations indiquées de B[a]P, de pyrène et de phénanthrène (solution mère préparée dans du DMSO) pendant 1h et leur survie a été évaluée par la fluorescence de la calcéine. Les cellules témoins ont été traitées avec du DMSO seul et leurs valeurs d'absorbance ont été normalisées à 100%. Les résultats sont représentés en tant que moyenne \pm SEM (déterminations en quadruple) et les valeurs de p sont indiquées lorsqu'elles sont significatives par rapport au contrôle, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

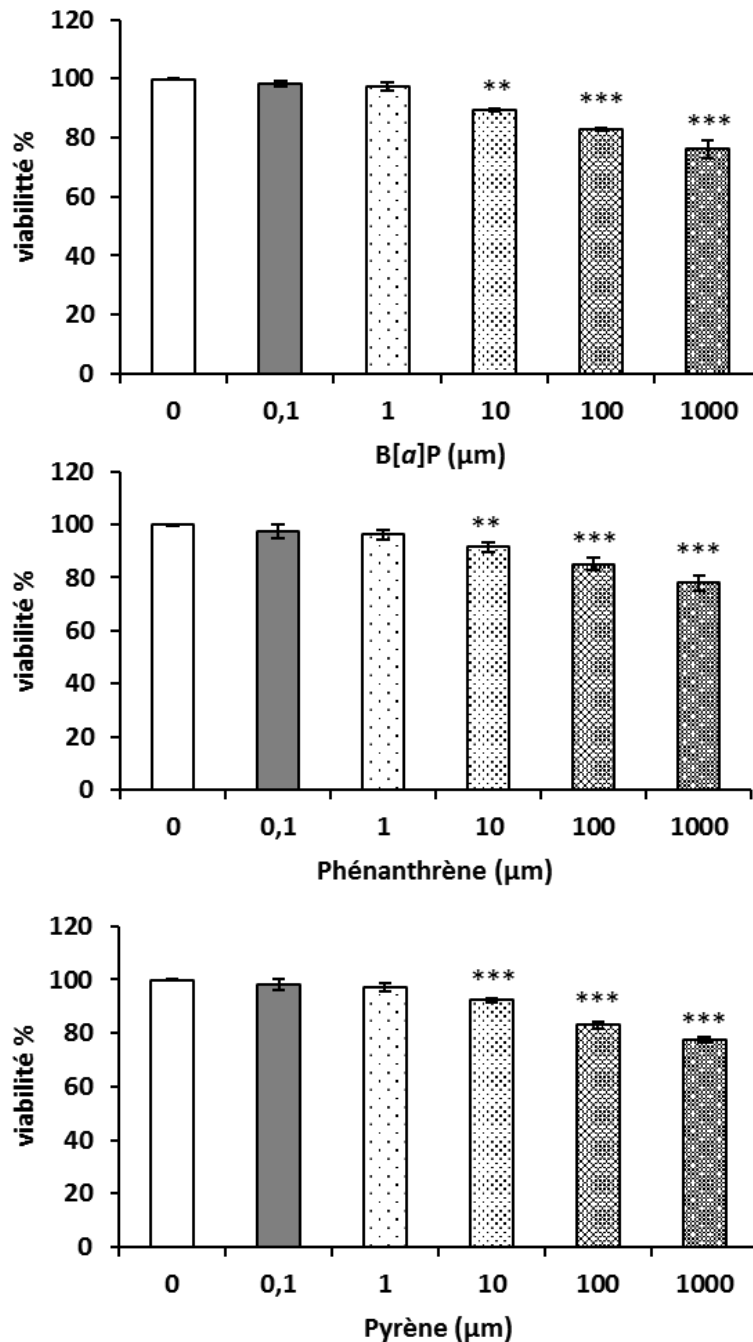


Figure 18: Effets du traitement par le B[a]P, le pyrène et le phénanthrène sur la viabilité des cellules Hepa 1-6 (test au bleu de trypan)

Les cellules ont été incubées avec les concentrations indiquées de B[a]P, de pyrène et phénanthrène (solution mère préparée dans du DMSO) pendant 1h et la survie des cellules a été évaluée par mesure de la coloration au bleu de trypan. Les cellules témoins ont été traitées avec le DMSO seul et leurs valeurs d'absorbance ont été normalisées à 100%. Les résultats sont représentés en tant que moyenne \pm SEM (les déterminations quadruples) et les valeurs de p sont indiquées lorsqu'elles sont significatives par rapport aux contrôles, ** p < 0,01 ; *** p < 0,001

1.4. Bilan des tests de viabilité

Les résultats des trois tests (MTT, calcéine et bleu de trypan) ont révélé que le B[a]P, le pyrène et le phénanthrène n'avaient aucun effet toxique après 1 h d'incubation lorsque des cellules Hepa1-6 y sont exposées à des concentrations inférieures ou égales à 1 μ M. Cependant, à des concentrations plus élevées, des effets toxiques sur les cellules ont été observés.

Ainsi, en ce qui concerne le B[a]P, le test au bleu de trypan a révélé des effets toxiques pour les concentrations en B[a]P supérieures à 1 μ M après 1h d'incubation, alors que les tests à la calcéine et au MTT ne montrent aucun effet toxique pour toutes les concentrations testées, les cellules restant viables aux concentrations de 10, 100 μ M et 1 mM. L'absence de toxicité apparente par le test à la calcéine pourrait s'expliquer par le principe même de ce test. En effet, le calcéine-acétoxyméthylester (calcéine-AM) est un composé lipophile qui pénètre dans les cellules par diffusion passive à travers la membrane plasmique (**Figure 19**). Une fois à l'intérieur des cellules, les estérases peuvent hydrolyser le calcéine-AM en calcéine, qui est emprisonnée dans le cytoplasme, car elle est chargée négativement. En outre, la calcéine est fortement fluorescente, mais le calcéine-AM n'est pas. Toutefois, la protéine MDR (*multi-drug resistance*) peut aussi transporter le calcéine-AM en dehors des cellules, mais pas la calcéine sur forme libre. Dans les cellules comme les cellules hépatiques qui expriment la MDR, le calcéine-AM qui traverse la membrane plasmique peut ainsi être « repompé » à partir des cellules avant d'être converti en calcéine et l'accumulation de la fluorescence reste relativement faible (Figure 19). Cependant, si un composé entre en compétition avec le calcéine-AM vis-à-vis de la MDR, il empêche l'efflux de calcéine-AM, et entraîne une augmentation de sa conversion en calcéine et une augmentation de la fluorescence, qui n'est pas liée à une augmentation de l'activité estérasique (Figure 19). Il est donc possible que le B[a]P puisse jouer un rôle de compétiteur avec calcéine-AM pour la MDR et empêche l'efflux calcéine-AM, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de la fluorescence observée et biaiser les conclusions sur la viabilité cellulaire.

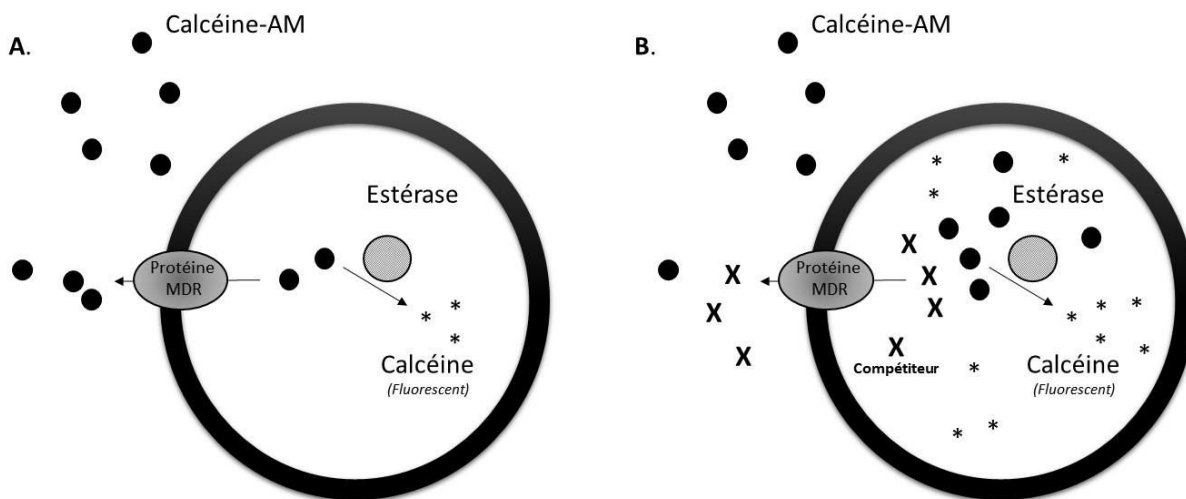


Figure 19: Principe de base de l'analyse du test à la calcéine et en présence d'un compétiteur pour la MDR.

(A) Le calcéine-AM peut pénétrer dans les cellules par diffusion passive à travers la membrane plasmique et être hydrolysé en calcéine (fluorescente) par les estérases cellulaires, ou transporté à partir des cellules par la protéine MDR avant d'être converti en calcéine qui reste emprisonnée dans le cytoplasme. (B) Les composés (symbole X) qui entrent en compétition avec la calcéine-AM pour la MDR diminuent l'efflux de calcéine-AM, entraînant une augmentation de sa conversion en calcéine et une augmentation de la fluorescence (<http://pdsp.med.unc.edu/pdspw/MDR.php>)

En ce qui concerne le test au MTT couramment utilisé pour cribler l'effet de divers composés sur la viabilité cellulaire, plusieurs rapports ont mis en évidence des agents capables d'augmenter la réduction du MTT en formazan, sans pour autant augmenter la viabilité des cellules, notamment des inhibiteurs d'efflux de différents médicaments, comme la génistéine, l'acide ursolique, le resvératrol et les interférons. Les résultats obtenus au cours de cette étude ont montré clairement une augmentation dose-dépendante de la réduction du MTT en formazan lors un traitement par le B[a]P, qui pourrait également être attribuable à un phénomène autre que la réduction de l'activité mitochondriale. Le test de viabilité au bleu de trypan qui est basé sur la seule coloration des cellules mortes, pourrait s'avérer une méthode plus fiable pour déterminer l'effet sur la viabilité suite au traitement par les polluants (Pagliacci *et al.*, 1993; Es-Saady *et al.*, 1996; Bernhard *et al.*, 2003; Vellonen *et al.*, 2004; Maioli *et al.*, 2009).

En résumé, même si l'interprétation de ces tests reste sujette à caution, nous pouvons conclure avec un bon degré de certitude que les polluants utilisés dans cette étude (B[a]P, pyrène et phénanthrène) ne sont pas toxiques pour les cellules Hepa1-6 tant que l'on travaille à des concentrations inférieures ou égales à 1 μ M. En effet, aucune différence n'est observée sur les

3 tests en présence des polluants par rapport au contrôle. De plus, l'analyse en Western blot montre que le taux d'expression protéique de la β -tubuline, une protéine du cytosquelette était inchangé après exposition des cellules Hepa1-6 aux trois polluants (concentrations inférieures ou égales à 1 μ M), ce qui constitue un argument supplémentaire en faveur de notre conclusion (Figure 20 A).

II. Effets du B[a]P, du pyrène et du phénanthrène sur l'expression du LSR, du LDL-R et de l'ABCA1

Nous avons effectué cette étude dans le but de rechercher si le B[a]P, le pyrène ou le phénanthrène exerçaient un effet sur le niveau d'expression protéique du LSR, du LDL-R et de l'ABCA1 dans les cellules Hepa 1-6. Pour ce faire, les cellules Hepa 1-6 ont été incubées pendant 1 h à 37°C avec différentes concentrations de B[a]P, de pyrène et de phénanthrène inférieures aux concentrations pour lesquelles une toxicité avait été démontrée précédemment (0,1 et 1 μ M). Après incubation, les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS 1X froid sur la glace et récupérées pour l'analyse par Western blot (**Figure 20 B**).

L'analyse par Western Blot n'a pas révélé de variation significative des niveaux d'expression protéiques pour le LSR, le LDL-R et l'ABCA1 à 0,1 et 1 μ M de pyrène et de phénanthrène, par rapport aux cellules contrôles traitées au DMSO seul. (**Figure 20 B**). En revanche, l'analyse a révélé une diminution significative de 2,7 , 1,15 et 1,9 fois respectivement, des niveaux d'expression protéique pour l'ABCA1, le LDL-R et le LSR suite au traitement des cellules par 0,1 μ M de B[a]P ainsi qu'une diminution significative de 3,7 , 1,35 et 3,4 fois respectivement, suite au traitement par une concentration de 1 μ M de B[a]P.

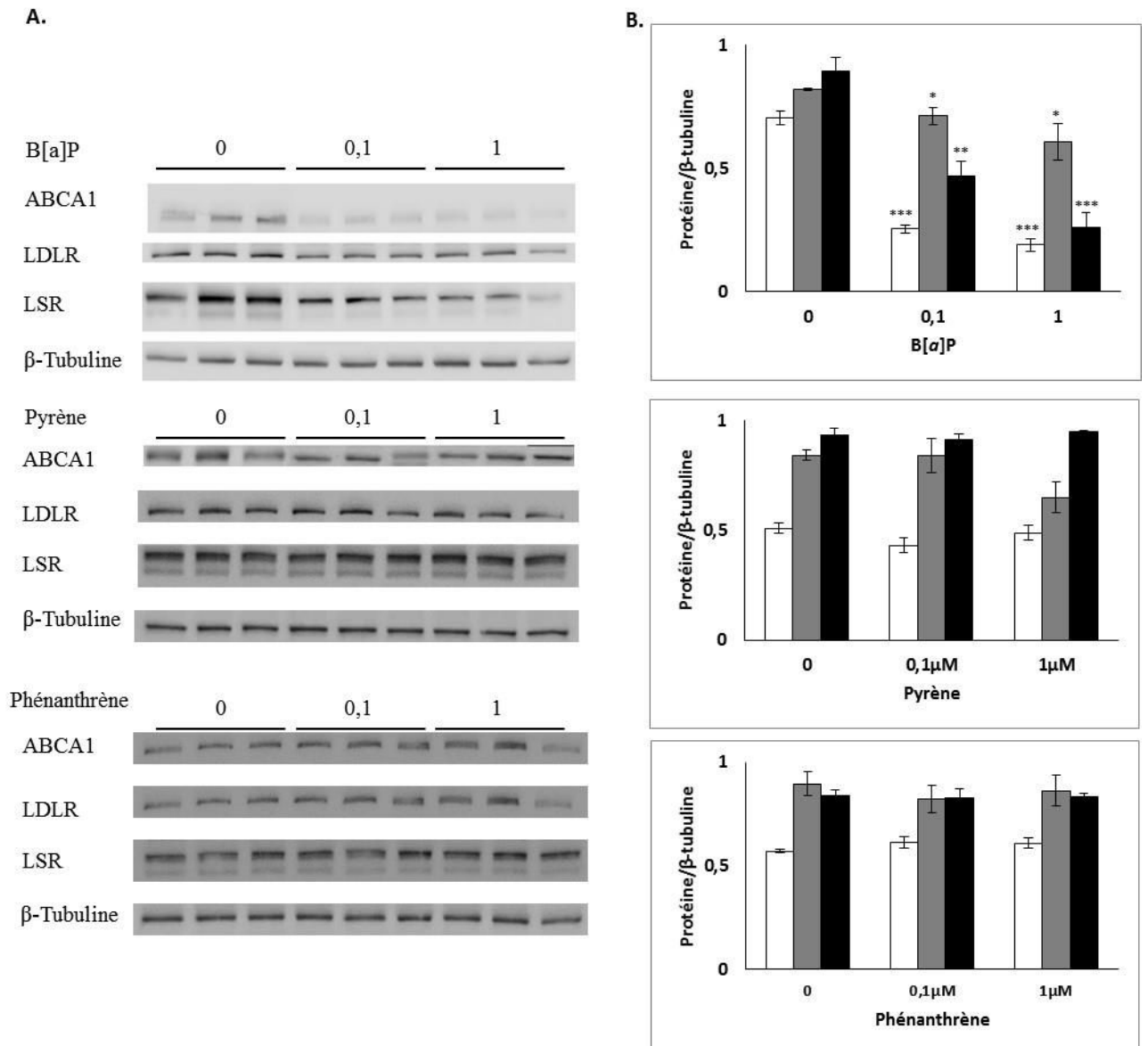


Figure 20: Effet du B[a]P, du pyrène et du phénanthrène sur le t d'expression protéique du LSR, du LDL-R et de l'ABCA1 dans les cellules Hepa 1-6.

Les cellules Hepa1-6 ont été incubées avec les concentrations indiquées de B[a]P, de pyrène ou de phénanthrène pendant 1 h. Une analyse par Western blot a été effectuée pour déterminer le niveau d'expression protéique du LSR, du LDL-R et de l'ABCA1 dans les lysats cellulaire. La β -tubuline a été utilisée comme témoin (loading control). (A) Le Western blot est présenté dans les panneaux de gauche, et (B) les résultats des analyses densitométriques pour ABCA1 (en blanc), LDL-R (en gris) et LSR (en noir) sont présentés dans les panneaux de droite. Chaque histogramme représente la moyenne \pm SEM de 3 puits individuels. La différence est considérée comme significative par rapport aux contrôles pour une valeur de $p^* < 0,05$; $** p < 0,01$ et $*** p < 0,001$, à l'issue du T-test.

III. Effets du B[a]P, du pyrène et du phénanthrène sur l'activité LSR dans les cellules Hepa1-6

Afin de déterminer si ces HAP avaient une influence sur l'activité de récepteurs des lipoprotéines, nous avons développé des essais consistant à mesurer la fixation de lipoprotéines (LDL) marquées sur les récepteurs exprimés en surface des cellules Hepa 1-6. Au cours de cette étude, nous nous sommes uniquement focalisés sur le récepteur LSR et avons suivi la fixation de lipoprotéines de type LDL, marquées avec un colorant hydrophobe "DiI" fluorescent, et traitées par la cyclohexanedione (CHD). Ce traitement était destiné à modifier les résidus d'arginine des apolipoprotéines des particules de LDL et de les rendre ainsi incapables de se lier avec le LDL-R (Shepherd and Packard, 1986).

De plus, l'activation du récepteur LSR par des AGL est une condition nécessaire pour induire le changement conformationnel permettant d'exposer le site de fixation pour les lipoprotéines (Bihain and Yen, 1992; Mann *et al.*, 1995), la longueur de la chaîne d'AG et de son degré de saturation joue également un rôle important dans la détermination de l'étendue de l'activation LSR, l'oléate s'étant révélé être le plus efficace.

3.1. Mise au point des conditions expérimentales : influence de la concentration en oléate

Nous avons dans un premier temps recherché quelle était la concentration en oléate adéquate pour avoir une activation efficace du récepteur dans nos conditions d'expériences. Pour ce faire, les cellules Hepa 1-6 cultivées dans un milieu sans sérum ont été traitées avec des concentrations avec oléate (0,5 et 0,8 mM) ou sans oléate, et 5 et 10 µg/mL de DiI-CHD-LDL pendant 1 h, comme décrit dans Matériels et Méthodes. L'analyse par immunofluorescence a révélé une augmentation de fixation de DiI-CHD-LDL à 0,5 et 0,8 mM d'oléate, comparativement au contrôle sans oléate (**Figure 21**).

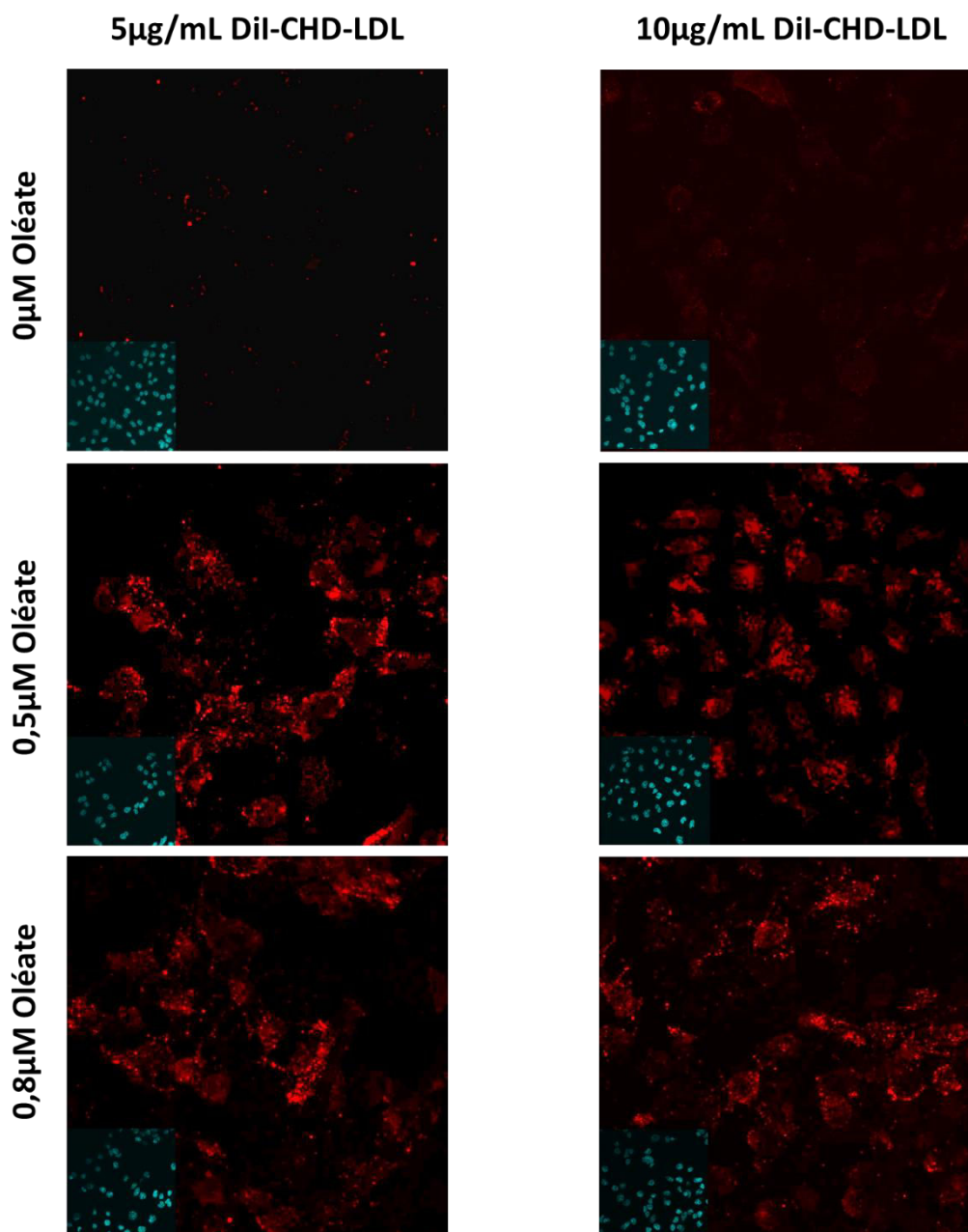


Figure 21: Images d'immunofluorescence montrant l'effet de l'oléate sur la fixation de Dil-CHD-LDL au LSR exprimé à la surface de cellules Hepa 1-6.

Les cellules Hepa 1-6 sur lamelles ont été incubées avec 0 ; 0,5 et 0,8 mM d'oléate pendant 3 min, puis avec 5 et 10 µg / mL de Dil-CHD-LDL pendant 1 h. Les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde à 4%. Les noyaux cellulaires ont été colorés avec le 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) (couleur bleue). Les Dil-CHD-LDL sont colorées en rouge. L'expérience a été répétée deux fois et les images ont été prises à partir d'au moins quatre champs aléatoires différents (n = 4), chaque lame ayant à peu près la même densité de cellules.

L'analyse de ces images d'immunofluorescence par le logiciel Image-J a confirmé une augmentation de fixation de Dil-CHD-LDL à 0,5 et 0,8 mM d'oléate, en comparaison au contrôle sans oléate (**Figure 22**).

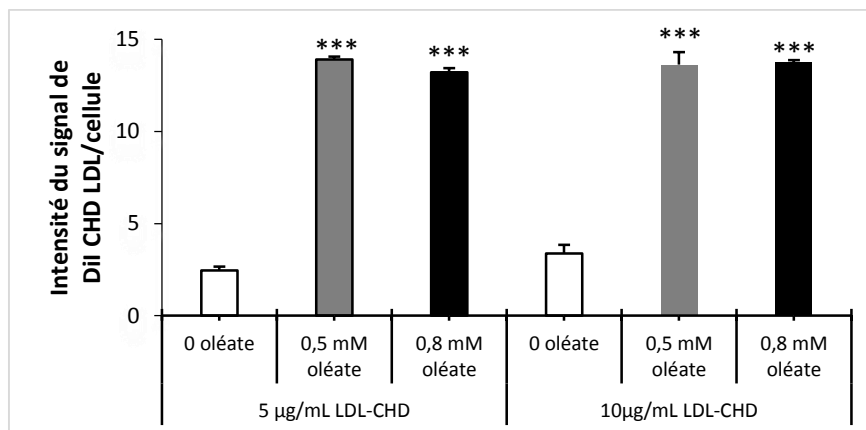


Figure 22: Effet de la concentration en oléate sur l'intensité du signal de fluorescence illustrant la fixation de DiI-CHD-LDL au LSR exprimé à la surface des cellules Hepa 1-6
 Les images présentées sur la figure précédente ont été analysées par le logiciel Image-J. Les intensités de fluorescence par cellule sont présentées en tant que moyenne \pm SEM ($n = 25$ cellules par condition). Les valeurs de p sont indiquées lorsqu'elles sont significatives par rapport à la condition de contrôle, *** $p < 0,001$

Par rapport au contrôle sans oléate, une augmentation significative de l'intensité de fluorescence a été observée lorsque les cellules étaient incubées avec 5 ou 10 µg/mL de DiI-CHD-LDL, ce qui traduit une augmentation de la fixation de DiI-CHD-LDL au LSR. Les deux concentrations en oléate testées, ainsi que les 2 concentrations en DiI-CHD-LDL donnant des résultats équivalents, nous avons retenu pour la suite de l'expérience une concentration en oléate de 0,8 mM et une concentration en DiI-CHD-LDL de 5 µg/mL.

3.2. Effet du B[a]P, du phénanthrène et du pyrène sur la fixation des DiI-CHD-LDL sur le récepteur LSR exprimé à la surface de cellules Hepa 1-6.

Pour cette expérience, les cellules Hepa 1-6 cultivées dans un milieu sans sérum ont été incubées avec 0,8mM d'oléate et puis avec 5 µg/mL de DiI-CHD-LDL déjà préincubées avec 1 µM de B[a]P, de pyrène ou de phénanthrène pendant 30 min (comme décrit dans Matériels et Méthodes). Après le traitement, les cellules ont été fixées et marquées avec un anticorps LSR pour déterminer le co-marquage du LSR avec les DiI-CHD-LDL. En comparaison au contrôle, l'analyse par immunofluorescence (**Figure 23**) a révélé une diminution de la fixation de DiI-CHD-LDL sur le LSR lorsque les DiI-CHD-LDL avaient été préincubées en présence des polluants.

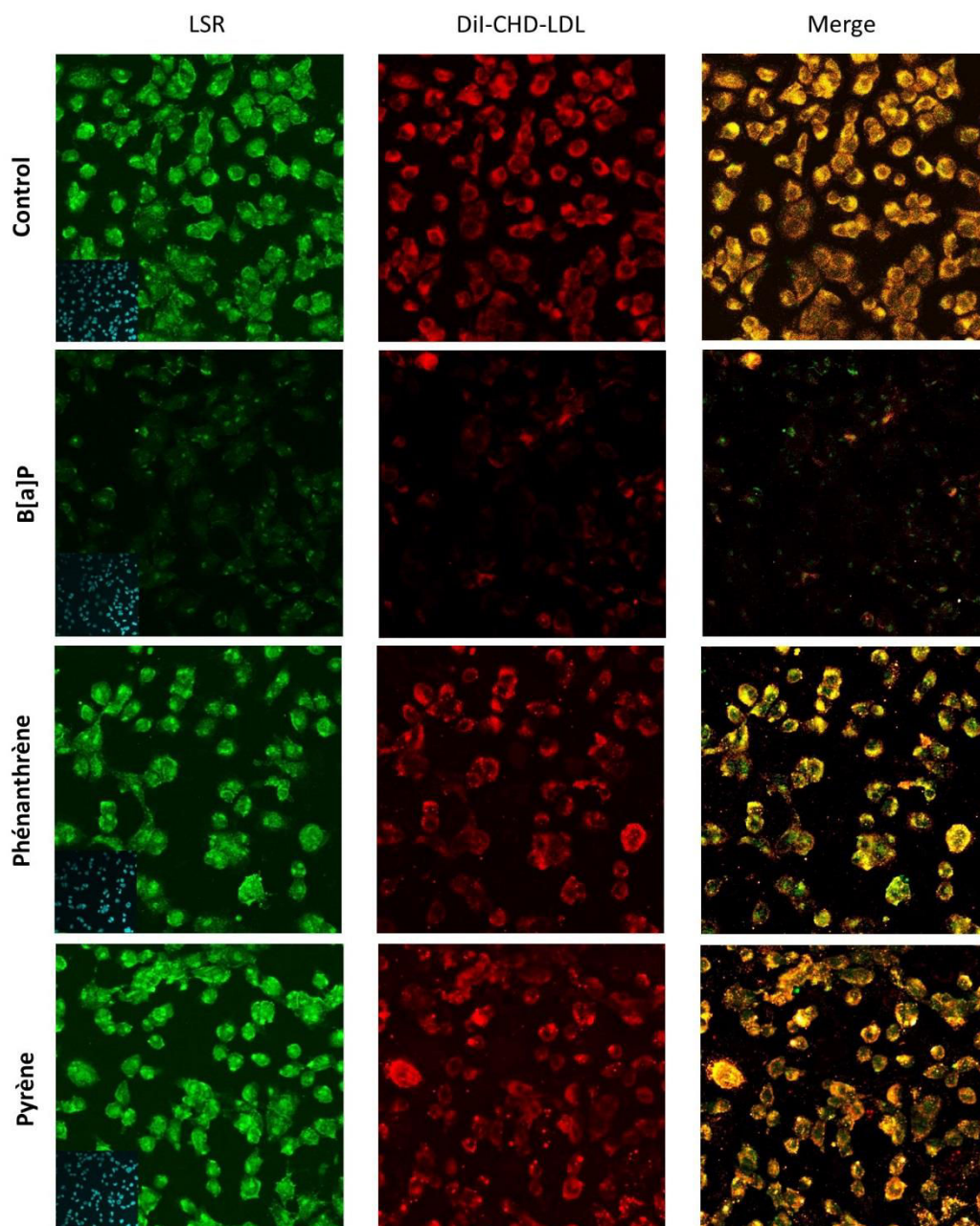


Figure 23: Effet du B[a]P, du pyrène et du phénanthrène sur la fixation de DiI-CHD-LDL sur le LSR exprimé à la surface de cellules Hepa1-6.

Les cellules Hepa 1-6 sur lamelles ont été incubées avec une concentration en oléate de 0,8 mM pendant 3 min. Les cellules ont ensuite été incubées avec 5 µg/mL DiI-CHD-LDL (contrôle) ou 5 µg/mL de DiI-CHD-LDL préincubées pendant 30 min avec du B[a]P, du pyrène ou du phénanthrène (1 µM) pendant 1 h. Les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde. Les noyaux cellulaires ont été colorés avec 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) (couleur bleue). Les images d'immunofluorescence montrent la co-localisation (couleur orange) des DiI-CHD-LDL (de couleur rouge) avec le LSR (de couleur verte, due à la conjugaison de l'anticorps secondaire avec l'Alexa Fluor® 488). L'expérience a été répétée deux fois et les images ont été prises à partir d'au moins quatre champs aléatoires différents (n = 4), chaque lame ayant à peu près la même densité de cellules.

L'analyse quantitative des résultats par le logiciel ImageJ-WCIF n'a révélé aucune modification significative de la fixation de DiI-CHD-LDL lorsque les cellules Hepa1-6 ont été exposés au DiI-CHD-LDL préincubées avec 1 μ M du pyrène ou phénanthrène en présence d'oléate. En revanche, malgré la présence d'oléate permettant l'activation du LSR, le B[a]P diminue la fixation ces particules sur ce récepteur.

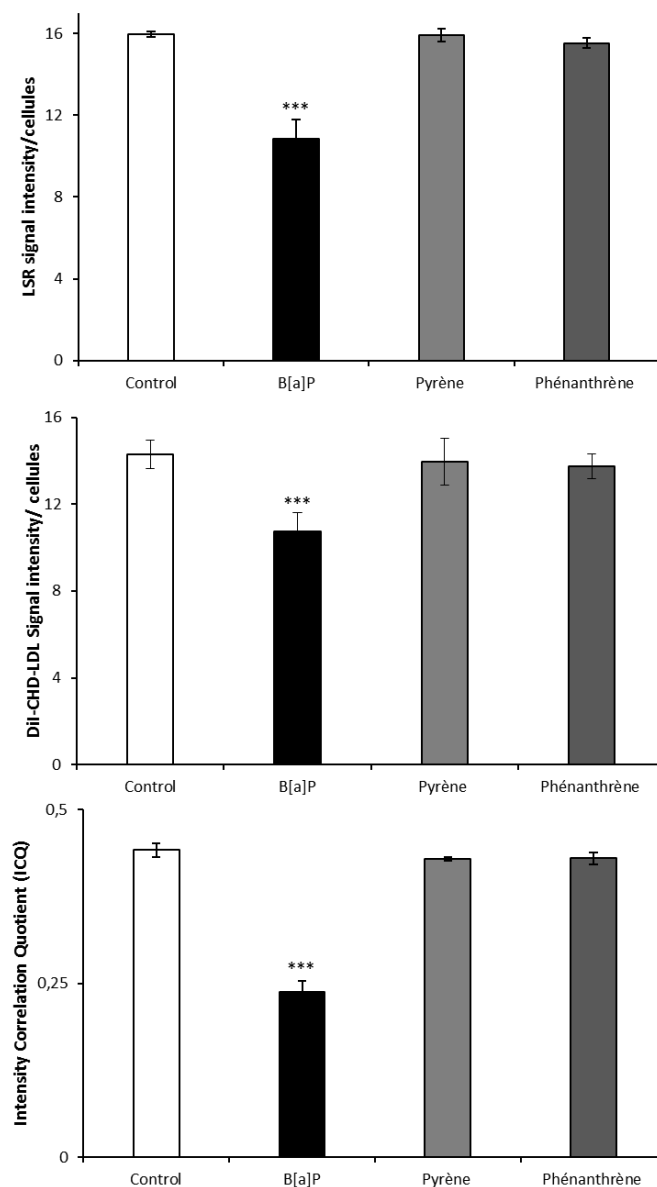


Figure 24: Analyse quantitative des images d'immunofluorescence (Figure 23) montrant l'effet du B[a]P, du pyrène et du phénanthrène sur la fixation des DiI-CHD-LDL.

Les images ont été analysées quantitativement en utilisant ImageJ-WCIF et les résultats sont présentés en tant que moyenne \pm SEM ($n = 25$ cellules par condition). Les valeurs de p sont indiquées lorsqu'elles sont significatives par rapport au contrôle, *** $p < 0,001$. Haut : intensité de fluorescence du LSR marqué à l'Alexa Fluor® 488 ; centre : intensité de fluorescence des DiI-CHD-LDL ; bas : intensité de fluorescence correspondant à la colocalisation du LSR avec les DiI-CHD-LDL.

L'analyse détaillée de ces histogrammes montre que la diminution de la fixation des DiI-CHD-LDL sur le LSR exprimé en surface des cellules (**Figure 24** bas) résulte de la combinaison d'une diminution de l'expression du LSR suite au traitement par le B[a]P (**Figure 24** haut), et également d'une diminution de la capacité des molécules de récepteurs présentes à fixer les lipoprotéines, la part de chaque contribution ne pouvant être estimée avec une bonne précision. C'est la raison pour laquelle, dans les travaux présentés au chapitre 2, nous avons choisi de remplacer cette méthodologie par des études en ligand-blot. Cette nouvelle approche permet en effet de déposer une quantité contrôlée d'extraits membranaires protéiques sur SDS-PAGE, et après transfert sur membrane, de mesurer la fixation de LDL incubées ou non avec du B[a]P, à quantité constante de LSR.

Néanmoins, même si nous ne pouvons pas estimer précisément la diminution de la capacité du LSR à fixer les lipoprotéines, plusieurs explications peuvent être avancées pour expliquer cet effet du B[a]P. La première concerne une perturbation de la structure membranaire par le B[a]P, qui modifierait l'environnement des protéines membranaires et perturberaient ainsi leur fonctionnement. En effet, une étude par polarisation de fluorescence (Jiang *et al.*, 1997) a conclu que l'exposition au B[a]P pouvait influencer la conformation des protéines membranaires. La seconde explication possible est liée à un éventuel changement conformationnel du LSR suite à la fixation du B[a]P sur ce récepteur, et la troisième concerne une modification de la structure ou des propriétés des lipoprotéines suite à la fixation du B[a]P. En effet, le B[a]P peut s'associer de façon non covalente avec les lipoprotéines (Plant *et al.*, 1985), l'apolipoprotéine B pouvant être la principale protéine *carrier* pour le B[a]P (Polyakov *et al.*, 1996). Des expériences complémentaires seraient nécessaires pour expliquer la diminution d'affinité du LSR pour les particules lipidiques dans les cellules. Nous avons néanmoins pu vérifier que le rayon dynamique moyen et la valeur du potentiel zeta (établie à partir de la mobilité électrophorétique) n'étaient pas modifiés pour les concentrations de B[a]P de l'ordre du micromolaire (*cf* publication, chapitre 2). Ils ne sont toutefois pas suffisants pour affirmer que l'affinité du LSR pour les LDL n'est pas modifiée lorsque du B[a]P est lié à ces particules.

IV. Conclusion

Au cours de cette étude, nous avons testé l'effet de 3 polluants de la famille des HAP, le B[a]P, le pyrène et phénanthrène, sur l'expression et l'activité de récepteurs des lipoprotéines, le LDL-R et le LSR ainsi que sur le transporteur ABCA1.

Ces premières études ont permis d'établir que le pyrène et le phénanthrène, à des concentrations n'ayant pas d'effet toxique sur les cellules, ne modifient pas l'expression protéique du LDL-R, du LSR et de l'ABCA1, alors que le B[a]P diminue l'expression de ces 3 protéines. De même, le pyrène et le phénanthrène ne modifient pas l'activité du récepteur LSR, mesurée par la fixation de lipoprotéines (LDL) fluorescentes sur les récepteurs exprimés en surface des cellules Hepa 1-6, alors que l'exposition de cellules au B[a]P engendre une diminution de la fixation des LDL.

Par ailleurs, des résultats antérieurs obtenus au laboratoire par P. Irigaray avaient établi que des souris qui avaient subi des injections de B[a]P par voie *i.p.* présentaient une augmentation significative de la prise de poids par rapport aux animaux contrôles, sans augmentation de la consommation de nourriture (Irigaray *et al.*, 2006), la prise de poids étant corrélée au taux de B[a]P plasmatique (Hutcheon *et al.*, 1983).

L'ensemble de ces études suggéraient donc que le B[a]P soit un bon modèle pour étudier l'effet de POP sur le métabolisme lipidique. Dès lors, pour la suite de notre travail, nous nous sommes focalisés uniquement sur le B[a]P, et nous avons d'une part, poursuivi les études réalisées dans ce chapitre sur des modèles cellulaires hépatiques, et d'autre part, entrepris des études *in vivo*, en choisissant comme conditions de traitement au B[a]P celles utilisées par P. Irigaray (2006), pour lesquelles un effet sur le poids avait été démontré. De plus, les effets *in vitro* sur les récepteurs LSR et LDL-R ainsi que sur ABCAI nous conduisent à l'hypothèse que le B[a]P pourrait avoir un impact sur le métabolisme lipidique *in vivo*. Ce travail a fait l'objet de la publication présentée dans le chapitre 2.

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 2

Inhibitory action of benzo[*a*]pyrene on hepatic lipoprotein receptors *in vitro* and on liver lipid homeostasis in mice

Hamed Layeghkhavidaki^{1,2}, Marie-Claire Lanhers^{1,2}, Samina Akbar^{1,2}, Lynn Gregory-
Pauron^{1,2}, Thierry Oster^{1,2}, Nathalie Grova³, Brice Appenzeller³, Jordane Jasniewski⁴, Cyril
Feidt^{1,2},
Catherine Corbier^{1,2}, Frances T. Yen^{1,2,5,*}

¹ Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux EA3998, Université
de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

² Institut National de Recherche Agronomique USC 0340, Vandœuvre-lès-Nancy, France,

³ Laboratory of Analytical Human Biomonitoring, Centre de Recherche Public de la Santé,
Luxembourg, Luxembourg,

⁴ Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy,
France

⁵ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Vandœuvre-lès-Nancy, France

* To whom correspondence should be addressed: Université de Lorraine, ENSAIA, URAFPA,
2 avenue de la Forêt de Haye, TSA 40602 F-54518 Vandœuvre-lès-Nancy France; Tel
+33.(0)3.83.59.61.84; Fax +33.(0)3.83.59.61.81; email: frances.yen-potin@univ-lorraine.fr

ABSTRACT

BACKGROUND

Dyslipidemia associated with obesity often manifests as increased plasma LDL and triglyceride-rich lipoprotein levels suggesting changes in hepatic lipoprotein receptor status. Persistent organic pollutants have been recently postulated to contribute to the obesity etiology by increasing adipogenesis, but little information is available on their potential effect on hepatic lipoprotein metabolism.

OBJECTIVE

The objective of this study was to investigate the effect of the common environmental pollutant, benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P) on two lipoprotein receptors, the LDL-receptor and the lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) as well as the ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) using cell and animal models.

RESULTS

LSR, LDL-receptor as well as ABCA1 protein levels were significantly decreased by 26-48% in Hepa1-6 cells incubated (< 2 h) in the presence of B[*a*]P ($\leq 1 \mu\text{M}$), Real-time PCR analysis and lactacystin studies revealed that this effect was due primarily to increased proteasome, and not lysosomal-mediated degradation rather than decreased transcription. Furthermore, ligand blots revealed that lipoproteins exposed to 1 or 5 μM B[*a*]P displayed markedly decreased (42-86%) binding to LSR or LDL-receptor. B[*a*]P-treated (0.5 mg/kg/48h, *i.p.* 15 days) C57BL/6J mice displayed higher weight gain, associated with significant increases in plasma cholesterol, triglycerides, and liver cholesterol content, and decreased hepatic LDL-receptor and ABCA1 levels. Furthermore, correlational analysis revealed that B[*a*]P abolished the positive

association observed in control mice between the LSR and LDL-receptor. Interestingly, levels of other proteins involved in liver cholesterol metabolism, ATP-binding cassette transporter G1 and scavenger receptor-BI, were decreased, while those of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 1 and 2 were increased in B[a]P-treated mice.

CONCLUSIONS

B[a]P demonstrates inhibitory action on LSR and LDL-R, as well as ABCA1, which we propose leads to modified lipid status in B[a]P-treated mice, thus providing new insight into mechanisms underlying the involvement of pollutants in the disruption of lipid homeostasis, potentially contributing to dyslipidemia associated with obesity.

INTRODUCTION

Obesity has become an increasing problem of public health in the industrialized world [1, 2], and represents a significant risk factor for many pathologies including cardiovascular disease and diabetes. Its origin is complex and multifactorial, where numerous genetic and environmental factors have been shown to contribute to the etiology of obesity. While the adipocyte represents the site of fat accumulation in obesity, the role of the liver as a central station for the reception and delivery of lipids in the form of lipoproteins to the different peripheral tissues should also be considered in investigations of the underlying causes of disrupted lipid status. Indeed, obesity is often associated with dyslipidemia, demonstrated by changes in plasma lipoproteins, including increased levels of triglyceride (TG)-rich lipoproteins (TGRL), and low-density lipoprotein (LDL), and sometimes decreased levels of high density lipoprotein (HDL) [3]. Increased TGRL in obesity has been attributed to overproduction of VLDL [4], but elevated postprandial lipemia in obese subjects suggests decreased ability to remove intestinally-derived chylomicrons. The removal of lipoproteins from the circulation is mediated by hepatic lipoprotein receptors, including the LDL-receptor (LDL-R), well-known for its key role in the regulation of cholesterol metabolism [5], but which also participates in the removal of TGRL. The lipolysis stimulated lipoprotein receptor (LSR) has recently been shown by our laboratory and others to play an important role in the removal of TGRL during the postprandial phase [6-8]. Interestingly, if these receptors are deficient (LSR^{+/-}) or lacking (LDL-R^{-/-}) in mice, the animals exhibit not only changes in plasma lipid levels, but also significantly higher weight gain when placed under high-fat diets as compared to wild-type littermates [9, 10]. LSR^{+/-} mice shown to have 50% reduced LSR expression and to display elevated postprandial lipemia and reduced lipid clearance also develop obesity with age, even if maintained on a standard diet [10], therefore suggesting that changes in lipoprotein receptor

status leading to dyslipidemia may also increase disposition towards excess weight gain, and thus increased propensity towards developing obesity.

Recent attention has focused on persistent organic pollutants (POP) as potential environmental factors involved in the etiology of obesity, due in part to epidemiological studies demonstrating a correlation between exposure to pollutants and increased risk or incidence of obesity [11, 12] as well as studies demonstrating their role as endocrine disruptors leading to increased adipogenesis [13, 14]. Among them includes the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P), which is a common pollutant that is produced during incomplete combustion of organic material including wood, coal, diesel, tobacco [15-17], and is also present in foods due to cooking processes including frying, smoking and grilling [18]. Levels of B[*a*]P in the circulation have been shown to be correlated to body mass index (BMI) in a population study [19]. We have shown that B[*a*]P can exert inhibitory effects on epinephrine-induced lipolysis in the adipocyte, and reported that mice exposed to this pollutant exhibit higher weight gain as compared to control mice [20]. Also, the carcinogenic properties of this environmental pollutant has already been demonstrated where reactive dihydrodiol epoxide derivatives of B[*a*]P metabolites derived from the cytochrome P450 system bind covalently to DNA, leading to adduct formation and subsequent tumors [21-23]. Further, B[*a*]P serves as ligand with the aryl hydrocarbon receptor (AHR) [24, 25], shown to be rate-limiting step in B[*a*]P-induced tumor formation [26].

While the carcinogenic aspect of this pollutant has been well-documented, little is known on its potential effect on lipid and lipoprotein metabolism. This pollutant circulates in the blood associated with lipoproteins [27, 28], can penetrate cells *via* biological membranes [29, 30] and subsequently accumulate not only in the lipophilic adipose tissue and mammary fat, but also in other tissues including the liver and kidney [31]. This led us to question if B[*a*]P could disrupt

lipid homeostasis *via* an effect on lipoprotein metabolism in the liver. Also, although B[a]P may be involved in regulating expression of multidrug resistance transporters [32], no information is available on its potential effect on ATP-binding cassette (ABC) proteins including ABCA1 which is involved in cholesterol efflux from the liver. In this study, we investigate and show evidence for the effect of B[a]P on hepatic lipoprotein receptors LDL-R and LSR, and on ABCA1, using both cell and animal models.

MATERIALS AND METHODS

Materials, antibodies and standards

Chemicals and reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France) unless otherwise indicated. Cell culture media and supplements were obtained from Invitrogen (Alfortville, France). Rabbit anti-LDL-R and anti-LSR antibodies were obtained from Abcam (Paris, France) and Sigma-Aldrich, respectively. Mouse anti-ABCA1 antibodies were purchased from Millipore (Darmstadt, Germany), and goat anti-ACAT1 and anti-ACAT2 antibodies from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany), respectively. Antibodies recognizing SR-BI or ABCG1 were obtained from Novus Biologicals (Cambridge, United Kingdom). Secondary anti-rabbit and anti-mouse peroxide-conjugated IgG were acquired from Cell Signaling Technology (Boston, MA). Anti-apolipoprotein (apo)B and anti-apoE antibodies, as well as rabbit peroxidase-conjugated anti-goat IgG were obtained from Santa Cruz Biotechnology. B[a]P-*d*₁₂, 1-OH-benz[a]anthracene-¹³C₆ and all B[a]P metabolites (including 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 11-, 12-OH-B[a]P, 4,5-diol- B[a]P cis, 7,8-diol-B[a]P cis, 7,8-diol-B[a]P trans, 9,10-diol-B[a]P trans) investigated in this study were purchased in powder form from MRI Global (Kansas City, MO, USA). B[a]P was purchased in powder form from Sigma-Aldrich. B[a]P standard, internal standards and OH-B[a]P standard stock solutions were prepared in acetonitrile (10 mg/L). Working solutions were prepared in

acetonitrile by successive ten-fold dilutions at concentration ranging from 1000 µg/L to 10 µg/L and were stored at -20°C.

Cell culture studies

The mouse Hepa1-6 liver cell line (DSMZ, Brunswick, Germany) was maintained in Dulbecco's modified Eagle Medium containing 10% fetal bovine serum and 1 mM glutamine [10]. Cells were seeded in 12-well or 24-well plates and used after 48 h at 80-90% confluence. On the day of the experiment, cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS), and then incubated at 37°C in 95% air, 5% CO₂ environment for the indicated times with 0.1 or 1 µM B[a]P in 1% (v/v) DMSO; control cells were treated with vehicle (1% (v/v) DMSO). The proteasome inhibitor lactacystin was prepared in DMSO and incubated with cells, with 1% (v/v) DMSO used as control. In experiments using chloroquine, this lysosomal inhibitor (25 µM) was first pre-incubated with cells 2 h at 37°C, before a second incubation of 1 h with 0.1 µM B[a]P or 1% (v/v) DMSO. At the end of the incubation periods, cells were then placed on ice and washed 2 times with ice-cold PBS. Cell lysates were recovered using ice-cold radioimmunoprecipitation assay buffer containing anti-proteases [10], followed by centrifugation at 13,000 x g for 30 min at 4°C. Protein was measured in the recovered supernatants using BCA assay (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France).

Cell viability and metabolic activity assays

In preliminary studies, viability of Hepa1-6 cells was determined using the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay [33]. Briefly, Hepa1-6 cells were incubated with filtered (0.22 µM) MTT (67 µg/mL, final concentration) for 20 min at 37°C, followed by incubation at room temperature with DMSO (50% v/v, final concentration) with gentle agitation for 10 min to dissolve the formazan crystals; absorbance was measured at 570 nm. A second method was used to assess cell viability and metabolic activity [34]. Hepa1-6

cells were incubated for 30 min at room temperature with 2 μ M calcein-AM. After washing with PBS, cells were incubated for 15 min at room temperature with 1% (v/v) Triton X-100 with gentle agitation. Fluorescence emission intensity was measured ($\lambda_{\text{emission}}=530$ nm and $\lambda_{\text{excitation}}=485$ nm).

Cell viability was also measured using the trypan blue exclusion assay. Aliquots of cells in serum-free medium were diluted with equal volumes of 0.4% (w/v) trypan blue. After 3 min incubation at room temperature, unstained and stained cells were counted in a hemacytometer.

Immunoblot analysis

Identical amounts of membrane protein or cell lysate (15-20 μ g) were separated on 10% SDS-PAGE gels, followed by transfer to nitrocellulose membranes. Loading was systematically verified using Red Ponceau staining. Immunoblotting was performed as previously described using the different antibodies as indicated [8, 10]. For cell lysates, β -tubulin was used as loading control. Protein bands were revealed by chemiluminescence (GE Healthcare, Orsay, France) using a peroxidase-conjugated secondary antibody and a chemiluminescence kit (GE Healthcare), followed by imaging on a Bio-Rad Fusion FX5 (Vilber Lourmat, France). Densitometric analysis was performed using ImageJ software.

In vivo study

Adult 10 week-old male C57Bl/6J mice weighing 20–22 g were obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France) and housed in temperature-regulated (20°C), ventilated cabinets with a 12 h light, 12 h dark cycle (8AM to 8PM) in a certified animal facility. Animals were acclimated in this controlled environment for 1 week prior to the study with a normal rodent chow diet and water *ad libitum* in a room with a mean temperature of 21–22°C and relative humidity of $50 \pm 20\%$.

The study protocols for animal handling and experiments were authorized by the Department for the Protection of Populations (DDPP, Meurthe et Moselle, authorization N° 54-547-24) and in accordance with the European Communities Council Directive of 2010/63/EU. All efforts were made to minimize suffering.

B[a]P was solubilized in physiological saline solution containing 5% DMSO and 1% methyl carboxy cellulose, and injected *i.p.* into mice at 8AM every 48 h at a dose of 0.5 mg/kg [20]. The first and last injections were on day 1 and day 15, respectively. The 11-week old animals were selected randomly for each group. Control animals received vehicle (n = 9 per group). Body weight and food intake of individually housed animals were measured at day 0, before every injection, and on day 16. On day 0 and day 16, animals were fasted for 4 h, and lightly anesthetized with isoflurane before blood sampling by submandibular bleeding. Blood (100 μ L) was directly placed into tubes containing EDTA on ice, and plasma was obtained by centrifugation at 13,000 x g at 4°C for 10 min. Samples were stored for analysis at -20°C. On day 16, animals were exsanguinated by cardiac puncture. Liver, epididymal fat pads of adipose tissue, and gastrocnemius muscle were rapidly dissected, rinsed in physiological saline, and snap frozen in liquid N₂ for storage at -80°C. Liver total membranes were prepared as described previously [35].

Analysis of lipoprotein profiles

Plasma samples of 4 mice from each group were pooled (210 μ L total) and then added to 290 μ L of 30 mM phosphate buffer containing 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 0.02% sodium azide, pH 7.4. This was applied (0.2 mL/min) to a Superose 6 10–300 GL column (GE Healthcare) equilibrated with the same buffer. Fractions of 500 μ L were collected and then analyzed for total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) content using the enzymatic kits as described previously [8].

Biochemical determinations

Lipids [(TG, TC, phospholipids (PL)] of plasma, tissue lipid extracts, and fractions from lipoprotein profiles were analyzed as previously described [8] using colorimetric enzymatic kits (Biomerieux, Craaponne, France) according to the manufacturer's instructions. A serum control (Unitrol) was included with each assay performed.

Real-time PCR analysis

Cell pellets ($1-2 \times 10^6$ cells) or frozen liver samples (40-60 mg) were homogenized in QIAzol Lysis reagent (Qiagen, Courtaboeuf, France), according to manufacturer's instructions. Total RNA was extracted using RNeasy lipid tissue minikit (Qiagen); the integrity of the RNA was verified by the presence of 28S and 18S bands on agarose gels. Ten micrograms of total RNA was used for RT from which 500 ng was used for real-time PCR, as described previously [8]. For LSR and LDL-R, reactions were prepared using the Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) SYBR Green PCR Master Mix and then performed on the StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems). Real-time PCR analysis for mouse ABCA1 was performed using a validated Taqman assay (Mm00442646_m1) obtained from Applied Biosystems. Relative expression calculations and statistical analyses were performed using the Relative Expression Software Tool (REST) 2009.

Ligand blot studies

Rat liver plasma membranes were prepared as previously described [36]. LDL ($1.025 < \text{density } (d) < 1.055 \text{ g/mL}$) and VLDL ($d < 1.006 \text{ g/mL}$) were isolated from pooled human plasma [8]. Ligand blots on solubilized protein from rat liver plasma membranes were performed as previously described for LSR [35] and LDL-R [37]. Solubilized membrane protein from rat hepatocyte were separated on a 10% SDS-PAGE gel, followed by transfer to nitrocellulose.

After blocking with 3% BSA, nitrocellulose strips were incubated for 30 min at 37°C with 0.8 mM oleate in the presence of 0.1 M phosphate buffer, 350 mM NaCl and 2 mM EDTA (pH 8.0) as described previously for optimal binding of lipoprotein to LSR [35]. For the LDL-R, the binding buffer used was 50 mM Tris-HCl, pH 8 containing 2 mM CaCl₂, 50 mg/mL of BSA and 90 mM NaCl [37] since binding of LDL-R to its ligand is Ca²⁺-dependent, unlike LSR. VLDL and LDL were preincubated at room temperature for 30 min in the absence or presence of 0, 1, or 5 μM B[a]P. The nitrocellulose strips were then incubated for 1 h at 37°C with 20 μg/mL B[a]P-VLDL or B[a]P-LDL protein, maintaining the same concentrations of B[a]P. Following washes with PBS containing 0.5% Triton X-100 for LSR, or 50 mM Tris-HCl, pH 8 containing 2 mM CaCl₂, 5 mg/mL of BSA and 90 mM NaCl for LDL-R, strips were incubated with rabbit anti-apoB and apoE IgG, followed by secondary conjugated antibodies to detect bound lipoprotein.

GC-MS/MS Analysis of B[a]P and its metabolites in blood

Samples (100 μL) were supplemented with 20 μL of 1-OHbenz[a]anthracene-¹³C₆ (at 1 mg/mL) and 10 μL of B[a]P-*d*₁₂ (at 1 mg/mL) as internal standards and adjusted to pH 5.7 with 200 μL of 1 M sodium acetate buffer. The hydrolysis, extraction and purification procedures were carried out in accordance with the analytical method recently described by Peiffer *et al.* [38]. Plasma extracts were reconstituted in 25 μL of MSTFA (N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide, Derivatization of target analytes was completed after 30 min at 60°C, and 2 μL of the extract were injected into the GC–MS/MS system. Analyses were carried out with an Agilent 7890A gas chromatograph equipped with a HP-5MS capillary column (30 m, 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness), coupled with an Agilent 7000B triple quadrupole mass spectrometer operating in electron impact ionization mode and an Agilent CTC PAL autosampler. Analytical conditions used for chromatography and MS/MS detection were as

previously described [39]. Calibration curves were performed using plasma specimens supplemented with increased concentration levels of B[a]P and of their metabolites from 0 to 125 ng/mL of plasma. Limits of quantification (LOQs) were evaluated at 0.25 ng/mL of plasma for B[a]P, ranged from 0.1 to 1.0 ng/mL for monohydroxylated- and dihydroxylated- forms of B[a]P.

Dynamic light scattering (DLS) and Zeta potential measurements

DLS and Zeta potential measurements were performed with a Zetasizer Nano ZS (Malvern, England) equipped with a 532 nm frequency doubled DPSS laser, a measurement cell, a photomultiplier and a correlator. Scattering intensity was measured at a scattering angle of 173° relative to the source using an avalanche of photodiode detector. The software used to collect and analyse the data was the Zetasizer Software version 6.34 from Malvern.

One mL of LDL or VLDL (refractive index 1.47; concentration of 20 µg protein/mL in Tris 0.2 mM) was measured in a clear disposable Zeta cell (DTS1060 Malvern). The measurements were made at a position of 5.50 mm and 2.00 mm from the cuvette wall for the DLS or Zeta potential measurements, respectively, with an automatic attenuator selection and at a controlled temperature of 25°C. This setup allows considerable reduction of the signal due to multiple scattering events and enables working in slightly turbid media. Intensity autocorrelation functions were analysed by CONTIN algorithm in order to determine the distribution of translational *z*-averaged diffusion coefficient of particles, D_T (m². s⁻¹). The D_T parameter is related to the hydrodynamic radius (R_h) of particles through the Stokes-Einstein relationship: $D_T = k_B T / 6\pi\eta R_h$, where η is the solvent viscosity (Pa.s), k_B is the Boltzmann constant (1.38 x 10⁻²³ N.m.K⁻¹), T is the absolute temperature (°K) and R_h (m) is the equivalent hydrodynamic radius of a sphere having the same diffusion coefficient than the particles. For each sample, 15 runs of 70 s were performed with three repetitions. Approximate Zeta Potential measurements

were obtained from the Smoluchowski equation and the electrophoretic mobility values determined using an automatic voltage selection. For each sample, 20 runs were performed with three repetitions.

Statistical analyses

All results are shown as mean \pm SEM, unless otherwise indicated. Statistical differences were tested using one-way or two-way ANOVA, or Student's *t* test as indicated; statistical significance was considered as $P < 0.05$. Correlations were evaluated using Pearson or Spearman rank correlation coefficients.

RESULTS

Effect of B[a]P on protein levels and mRNA expression of LDL-R, LSR and ABCA1 in mouse Hepa1-6 cells

We first sought to determine the effect of B[a]P on LSR, LDL-R in mouse Hepa1-6 cells, which have been shown previously to express both of these lipoprotein receptors [8]. In preliminary studies in which cells were incubated 1 h at 37°C with increasing concentrations of B[a]P from 0.1-100 µM, cell viability, mitochondrial and metabolic activities were not significantly affected, using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), calcein, and trypan blue as read-outs (Supplementary Figure S1). Since we had previously observed that this pollutant displayed inhibitory action on epinephrine-induced lipolysis in adipocytes at concentrations < 1 µM [20], experiments were performed using similar concentrations. Immunoblots of the lysates from Hepa 1-6 cells incubated at 37°C with 0.1 and 1 µM of B[a]P revealed that B[a]P induced a significant decrease in the levels of LSR and LDL-R in a dose-dependent manner (Fig. 1A, left and middle panels). For LSR (Fig. 1A, left panel), two LSR bands are typically observed, corresponding to the α (or α') and the β LSR subunits [40]; both subunits were decreased after 1 h incubation with B[a]P (Fig. 1A, left panel), while for LDL-R a 2-h incubation was necessary to observe a significant B[a]P-induced decrease of this receptor (Fig. 1A, middle panel). Similarly to LSR, ABCA1 protein levels were significantly decreased after 1 h incubation of cells with B[a]P (Fig. 1A, right panel). No significant change was observed in the β -tubulin loading control, indicating that these effects did not appear to be related to the general state of the cells.

Figure 1

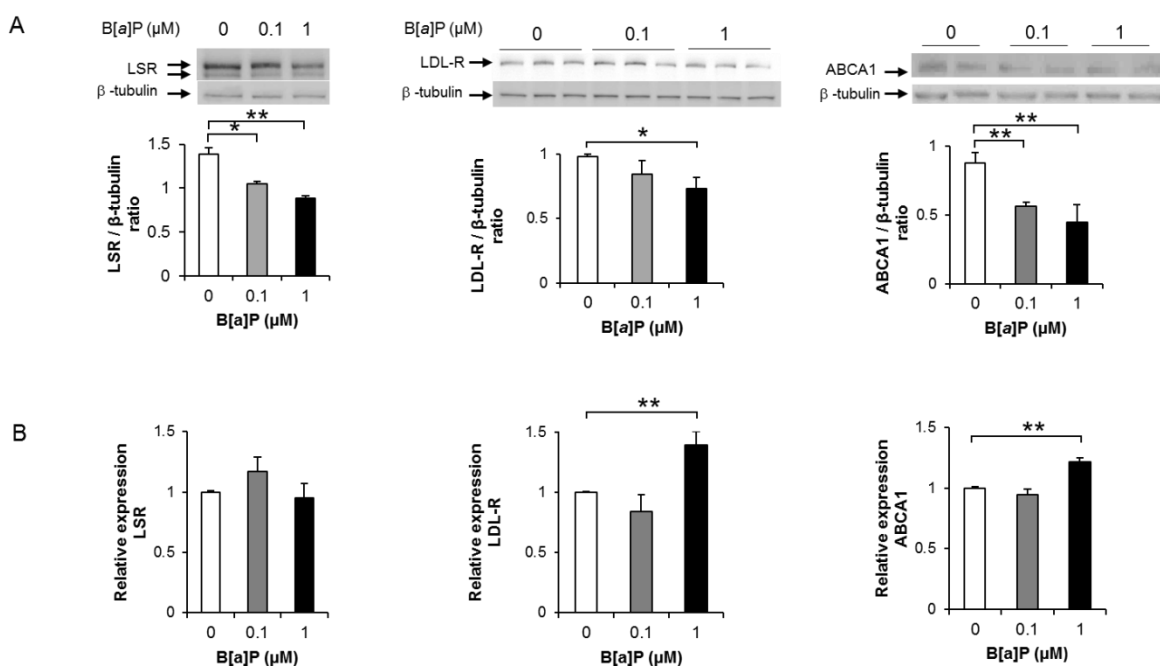


Figure 1. Effect of B[a]P on LSR, LDL-R and ABCA1 protein and mRNA levels in Hepa1-6 cells. A) Hepa1-6 cells were incubated at 37°C for up to 2 h in the absence or presence of the indicated concentrations of B[a]P, after which cell lysates were prepared as described in Methods. Representative immunoblots (for LSR and ABCA1, results of 1-h incubation are shown; for LDL-R, results for 2-h incubation are shown) and corresponding densitometric analyses using β -tubulin as internal control are shown (one-way ANOVA, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, as compared to 0 μM B[a]P, $n = 3$ different cell preparations using duplicate or triplicate wells). B) mRNA levels of LSR, LDLR and ABCA1 were determined in cells incubated with the indicated concentrations of B[a]P using real-time PCR, as described in Materials and Methods. Results are shown ($n = 4$ in triplicate) of LSR, LDLR and ABCA1 mRNA expression relative to HPRT, used as reference housekeeping gene. It should be noted that there was no significant change in HPRT expression under the different conditions ($**P < 0.01$ as compared to 0 μM B[a]P).

A second set of cells were treated similarly, from which mRNA was isolated to perform qPCR analysis. Results presented in Figure 1B revealed no significant change in LSR expression relative to the housekeeping gene HPRT, nor for that of LDL-R and ABCA1 in cells incubated in the presence of 0.1 μM B[a]P. A small but significant increase in relative expression of LDL-R and ABCA1 was observed when B[a]P concentrations were increased to 1 μM (Fig. 1B, middle and right panels) contrary to the decreased protein levels (Fig. 1A). Nonetheless, the

results showed that the decrease in protein levels of LSR, LDL-R and ABCA1 was not due to decreased transcription.

Inhibition of B[a]P effect by lactacystin in cells

The lack of significant decreases of mRNA levels in Hepa1-6 cells led us to question if the B[a]P-induced effect could have occurred by increasing catabolism, rather than by inhibition of the synthesis of the proteins affected. Ubiquitin-mediated proteolysis in the proteasome is intimately involved in the removal of numerous cellular proteins, and little is known regarding PAH's potential involvement in the proteasome pathway. Cells were exposed to the proteasome inhibitor lactacystin for up to 24 h, and immunoblots revealed that LSR, LDL-R and ABCA1 protein levels in Hepa1-6 cells were all significantly increased after 2 h incubation in the presence of lactacystin (Supplementary Figure S2). Another set of cells were then treated 1 h with 10 μ M lactacystin, followed by addition of 0.1 μ M B[a]P and an additional incubation of 1 h. Results of the immunoblots confirmed the B[a]P-induced decrease of LSR, LDL-R and ABCA1, as well as their increased protein levels in the presence of lactacystin (Fig. 2). In cells pre-incubated with lactacystin, protein levels of LSR and LDL-R were slightly lower when B[a]P was present, but did not reach statistical significance as compared to cells pre-incubated with lactacystin in absence of B[a]P. The B[a]P-induced decrease of ABCA1 in the presence of lactacystin was significant as compared to cells incubated with lactacystin alone. However, this decrease was 2-fold lower as compared to the effect of B[a]P on cells in the absence of lactacystin. These data suggest therefore that lactacystin prevented the B[a]P-induced decrease of LSR, LDL-R and ABCA1 protein levels, thus suggesting that the effect of this pollutant was mediated through increased degradation in the proteasome.

Figure 2

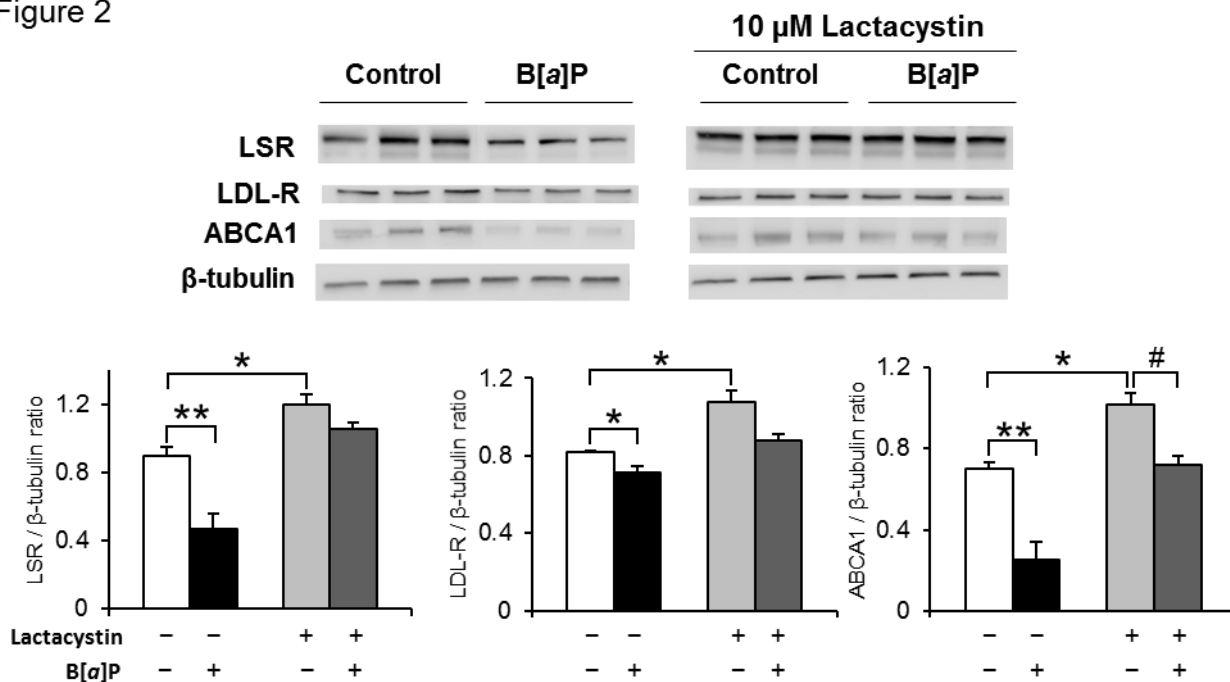


Figure 2. Lactacystin effect on B[a]P-induced decrease of LSR, LDL-R and ABCA1 protein levels in Hepa1-6 cells. Hepa1-6 cells were preincubated for 1 h at 37°C with 10 μM lactacystin, followed by 1-h incubation with 0.1 μM B[a]P with lactacystin still maintained in the cell medium. Immunoblots were performed on cell lysates, to detect LSR, LDL-R and ABCA1, and are shown with corresponding densitometric analyses (two-way ANOVA, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs cells incubated in absence of lactacystin and B[a]P; # $P < 0.05$ vs cells incubated with lactacystin alone, $n = 3$ different wells per treatment).

Once internalized by endocytosis, ligand-bound receptors can be eventually degraded in the lysosome. We performed experiments similar to those described for lactacystin, using chloroquine instead to inhibit lysosomal activity. Results of immunoblots revealed a small but significant increase in LDL-R, but not LSR in cells incubated with chloroquine alone (Fig. 3). B[a]P-induced decrease of both LSR and LDL-R remained identical, either in the absence or presence of chloroquine (Fig. 3), suggesting that the observed B[a]P-mediated effect was not due to increased degradation in the lysosome.

Figure 3

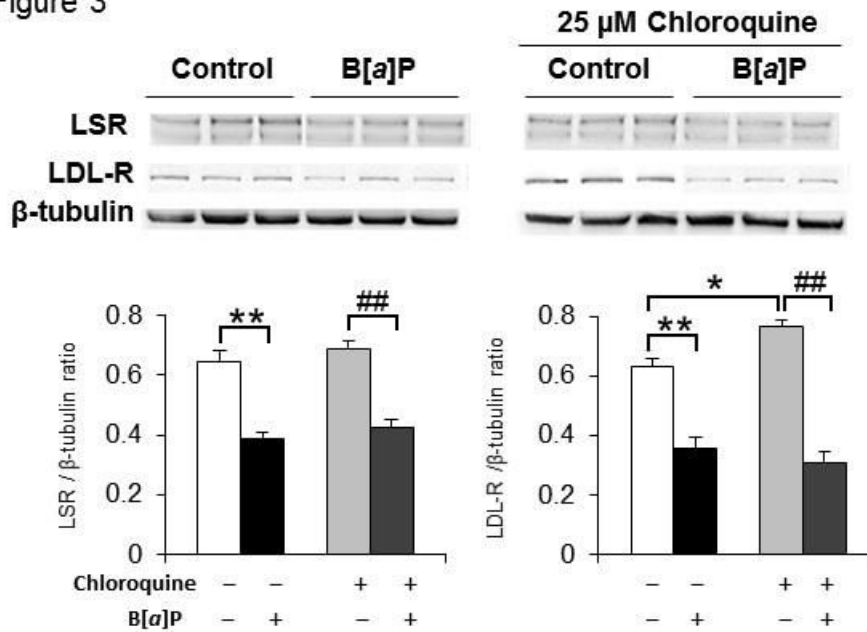


Figure 3. Chloroquine effect on B[a]P-induced decrease of LSR, LDL-R protein levels in Hepa1-6 cells. Hepa1-6 cells were preincubated for 2 h at 37°C with 25 μM chloroquine, followed by 1-h incubation with 0.1 μM B[a]P with chloroquine still maintained in the cell medium. Immunoblots were performed on cell lysates, to detect LSR and LDL-R, and are shown with corresponding densitometric analyses (two-way ANOVA, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs cells incubated in absence of chloroquine and B[a]P; ## $P < 0.01$ vs cells incubated with chloroquine alone, $n = 3$ different wells per treatment).

In view of these changes, we next sought to determine the effect of B[a]P *in vivo*. We had previously established that mice treated with B[a]P displayed significantly higher weight gain as compared to controls [20]. The same experimental conditions were therefore used to determine the effect of B[a]P on hepatic lipid and lipoprotein metabolism.

Effect of B[a]P on plasma and tissue lipids

Eleven-week old C57BL/6J male mice on a standard diet were injected *i.p.* with 0.5 mg B[a]P/kg/48 h (mice were used one week after delivery following a 1 week quarantine). As reported previously [20], body weight increased in both groups continuously during the treatment period (Fig. 4A). At the end of the experimental period, B[a]P-treated mice exhibited 26% greater weight gain as compared to controls ($P < 0.03$). Monitoring of food intake revealed no detectable difference between the control and experimental groups (Fig. 4B).

Figure 4

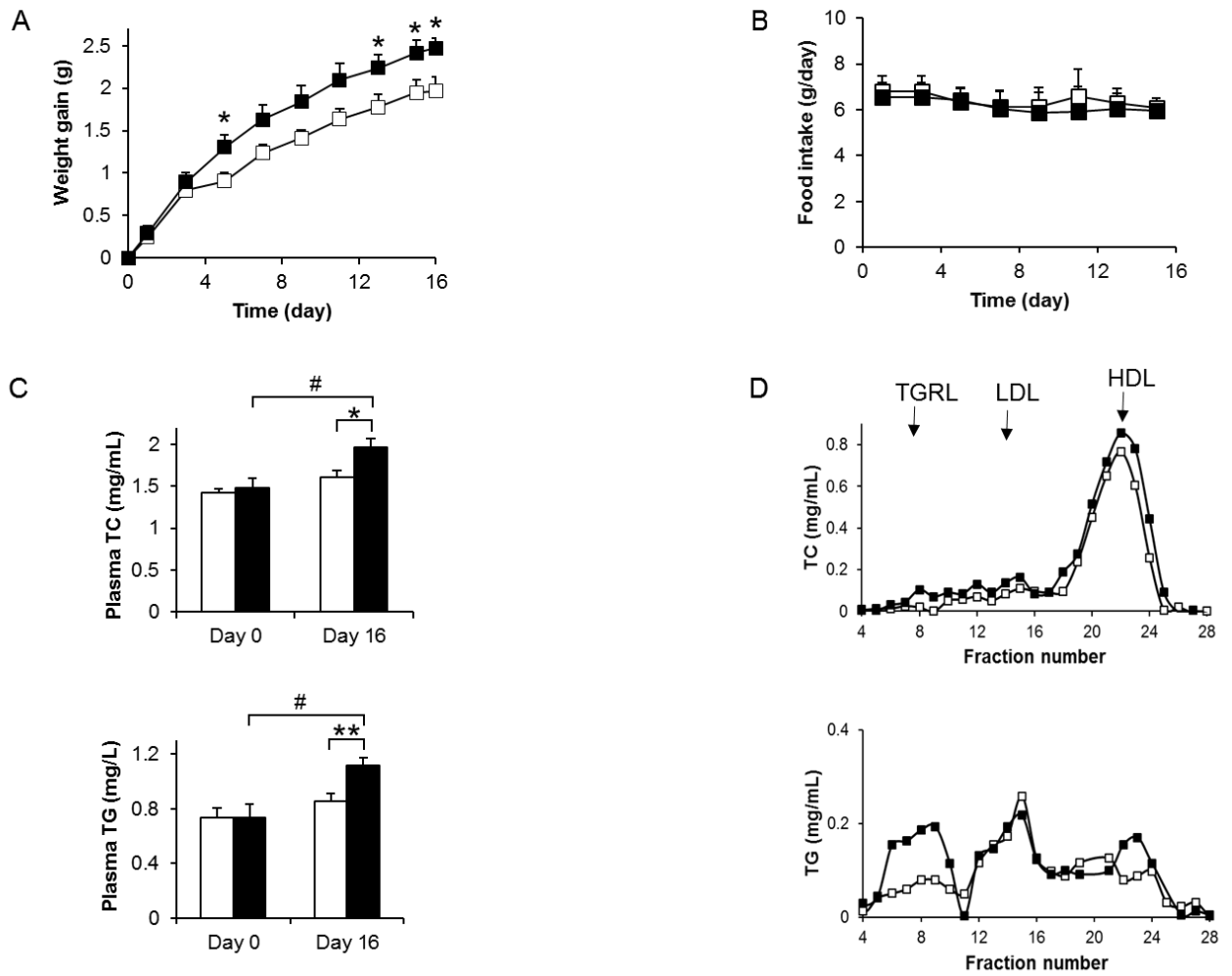


Figure 4. B[a]P effect on (A) body weight gain, (B) food intake, (C) plasma lipids, (D) lipoprotein profile in mice. Male 11 week-old C57BL/6J mice were *i.p.* injected every 48 h with vehicle alone (□, n=9) or vehicle containing 0.5 mg/kg B[a]P (■, n=9) from day 1 to day 15 and monitored for (A) weight gain (two-way ANOVA, * $P < 0.05$ B[a]P group as compared to control group), and (B) food intake. (C) Plasma total cholesterol (TC) and triglycerides (TG) were measured on Day 0 and Day 16 in plasma of 4-h fasted animals (two-way ANOVA * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ B[a]P Day 16 vs control Day 16, # $P < 0.05$; B[a]P Day 16 vs B[a]P Day 0). (D) Lipoprotein profiles were obtained from pooled plasma samples obtained on day 16 using gel filtration chromatography as described in Materials and Methods. Fractions were analyzed for TC (upper panel) and TG (lower panel) content. The elution of TG-rich lipoproteins (TGRL), LDL and HDL are indicated by arrows.

Plasma levels of B[a]P were measured on day 16, and found to be significantly higher in B[a]P-treated animals as compared to controls (0.38 ± 0.04 ng/mL and 0.69 ± 0.09 ng/mL for control and B[a]P-treated animals, respectively, $P < 0.05$). With regards to B[a]P metabolites, none were detected in plasma of both control and B[a]P-treated mice.

Analysis of plasma after a 4-h fasting period revealed that both plasma TC and TG significantly increased (32 and 51%, respectively) between day 0 and day 16 in animals treated with B[a]P, whereas there was no significant difference in mice treated with the vehicle (Fig. 4C). Consequently, the levels of plasma TC and TG were higher (22 and 31%, respectively), in the B[a]P-treated mice as compared to controls on day 16. The analysis of lipoprotein profiles from pooled plasma samples using gel filtration chromatography revealed a slight increase of cholesterol levels in the fraction containing TGRL (VLDL and chylomicrons) (Fig. 4D, upper panel), as well as that containing HDL. Since TG is the major lipid component of VLDL lipoproteins, we also measured TG in the fractions and observed an increase primarily in the fractions containing TGRL as compared to those containing LDL or HDL (Fig. 4D, lower panel). This suggests that the observed increase in plasma TG was most likely due to an increase in the TGRL fraction in plasma of B[a]P-treated animals.

Mice were sacrificed on day 16 and liver, adipose tissue and skeletal muscle were removed for lipid composition analysis. A small, but significant increase in liver TC content was observed in the B[a]P group compared with controls (Table 1). Since liver PL also increased, although not significantly, this may explain the similar TC/PL ratios in both groups. A significant increase (29%) in TG content of adipose tissue of B[a]P-treated mice was observed, as compared to those of control animals (Table 1), consistent with the increased fat mass observed in B[a]P-treated animals [20].

Table 1. Tissue lipid content of control and B[a]P-treated mice

	Liver		Adipose Tissue		Skeletal muscle	
	Control ^a	B[a]P ^a	Control ^a	B[a]P ^a	Control ^a	B[a]P ^a
	(μg/mg dry weight)					
TC	4.4 ± 0.14	5.1 ± 0.21*	0.3 ± 0.02	0.5 ± 0.07*	1.8 ± 0.16	1.9 ± 0.07
TG	9.3 ± 0.51	9.6 ± 0.69	3.5 ± 0.22	4.5 ± 0.49*	4.1 ± 0.26	4.4 ± 0.23
PL	18.2 ± 0.61	19.9 ± 0.96	2.6 ± 0.30	2.2 ± 0.30*	16.9 ± 0.52	15.6 ± 0.85
	(ratio)					
TC/PL	0.24 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.24 ± 0.02**	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.004
TG/PL	0.52 ± 0.04	0.50 ± 0.06	1.50 ± 0.20	2.23 ± 0.25**	0.24 ± 0.01	0.26 ± 0.01

^a mean ± SEM (n = 9 for each group)

P* < 0.05, *P* < 0.01, as compared to control group

TC content of adipose tissue, although a minor component in adipose tissue compared to TG, was also significantly increased in mice treated with B[a]P. This was similarly the case if expressed as ratios relative to PL in adipose tissue. If it is assumed that PL as a major cell membrane constituent represents an estimate of cell number, this would suggest increased lipid content relative to the number of adipocytes. No detectable difference in lipid content was observed in skeletal muscle.

Immunoblots on protein solubilized from liver total membranes revealed that protein levels of both LDL-R and ABCA1 were significantly decreased (34% and 22%, respectively) in B[a]P-treated mouse liver membranes as compared to those of controls (Fig. 5A, middle and right panels), qPCR analysis revealed that mRNA levels were modified in a similar manner (Fig. 5B, middle and right panels), although the difference was only significant for ABCA1. The increase in hepatic TC also led us to examine other proteins involved in cholesterol uptake and transport in the liver. Hepatic protein levels of ABCG1 were decreased as well as that of the scavenger receptor SR-BI, which is involved in HDL uptake (Supplementary Fig. S3A and S3B).

Interestingly, both ACAT1 and ACAT2 which are enzymes involved in cholesterol esterification were elevated in mice treated with B[a]P (Supplementary Fig. S3C and S3D).

Figure 5

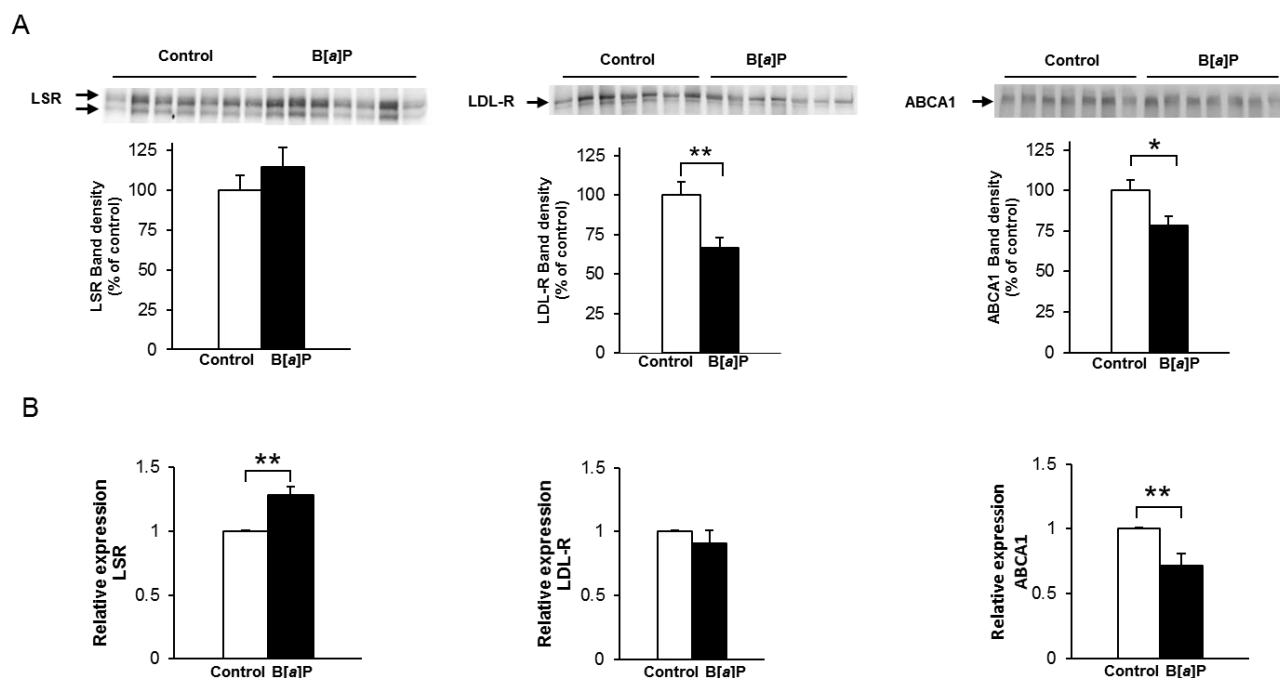


Figure 5. Effect of B[a]P on mouse hepatic LDL-R, LSR, and ABCA1 protein and mRNA levels. **A)** Immunoblots to detect LDL-R, LSR, and ABCA1 were performed on protein solubilized from liver total membranes isolated from control and B[a]P-treated mice. Blots are shown with corresponding densitometric analysis (Student's t-test, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ B[a]P as compared to control groups, $n = 7$ for each group). **B)** mRNA levels of liver LSR, LDLR and ABCA1 isolated from control and B[a]P-treated mice were determined using real-time PCR, as described in Materials and Methods. Results are shown for LSR, LDLR and ABCA1 mRNA expression relative to HPRT, used as reference housekeeping gene. There was no significant changes in HPRT expression under the different conditions ($**P < 0.01$ as compared to control mice; triplicate determinations of $n = 4$ per group).

LSR protein levels did not appear significantly different (Fig. 5A, left panel), while LSR mRNA was slightly but significantly higher in B[a]P-treated mice (Fig. 5B, left panel) As we had previously suggested a potential cooperativity between both receptors in the removal of TG-rich lipoproteins [8], and in view of the inter-individual variation of LSR protein observed in B[a]P-treated mice (Fig. 5A, left panel), protein levels for both LSR and LDL-R in each animal were compared on a scatter plot (Fig. 6). Interestingly, a significant positive correlation between hepatic LDL-R and LSR protein levels in control animals was observed. However, this

correlation was no longer present in animals exposed to B[a]P, which led us to question if other potential correlations could be detected between plasma and tissue lipid parameters.

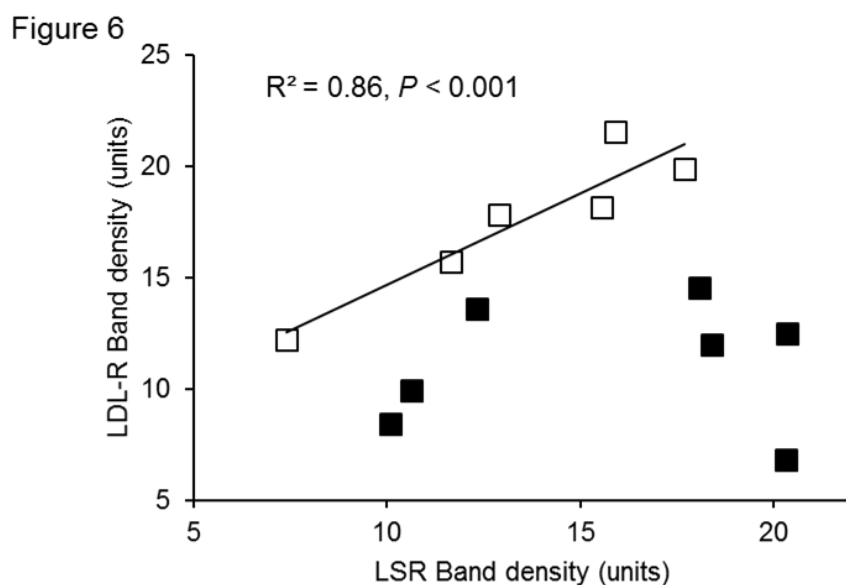


Figure 6. Scatter plot between hepatic LSR and LDL-R in mice. Distribution of individual values for liver membrane LSR and LDL-R protein levels are shown for mice from control (□) and B[a]P-treated (■) groups.

Spearman rank correlation analysis was thus performed, and confirmed the positive correlation (Fig. 6) between LSR and LDL-R in control, but not B[a]P-treated animals (Table 2). Also, in B[a]P-treated mice, but not control animals, a positive correlation was detected between LDL-R and plasma TC, and negative correlations were observed between LDL-R and liver TC/PL ratio, as well as between LSR and liver TG/PL. ABCA1 protein levels were significantly correlated positively with plasma TG and negatively with liver TG/PL and TC/PL ratios, but again, only in B[a]P-exposed animals, and not in controls (Table 2). B[a]P exposure therefore appears to significantly modify relationships between LSR, LDL-R, or ABCA1 and various plasma and liver lipid levels, which would support the notion that exposure to B[a]P leads to dysfunction of the regulation of lipid homeostasis in these mice.

Table 2. Correlational analysis of lipid parameters measured in control and B[a]P-treated mice

Parameter	LSR		LDL-R		ABCA1	
	Control ^a	B[a]P ^a	Control ^a	B[a]P ^a	Control ^a	B[a]P ^a
	Spearman correlation (ρ)					
Plasma TC	-0.42	-0.39	-0.31	0.82*	0.25	0.42
Plasma TG	0.10	0.54	0.60	0.71	0.00	0.80*
Liver TC/PL	-0.32	0.14	-0.50	-0.93**	0.64	-0.79*
Liver TG/PL	0.04	-0.75*	0.32	-0.61	-0.43	-0.82*
LSR	--	--	0.94**	0.10	0.21	0.57
LDL-R	--	--	--	--	-0.21	0.67
ABCA1	--	--	--	--	--	--

^a n = 7 for each group

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared to control group

Effect of B[a]P on lipoprotein binding to receptors

Since studies have shown that B[a]P in the circulation is found associated with lipoproteins [27, 28], the question arose as to whether B[a]P could directly affect the ability of lipoproteins to bind to LSR and LDL-R. To address this, we chose to use *in vitro* ligand blots, where a constant amount of receptor protein could be maintained, while exposing lipoproteins to different concentrations of the pollutant. The Ca²⁺-dependent (LDL-R) and -independent (LSR) binding properties, as well as apparent molecular weight of these two receptors allowed us to clearly distinguish the two receptors. Furthermore, LSR binds apoB- and apoE-containing lipoproteins (VLDL and LDL) only in the presence of oleate [7, 41], while this free fatty acid inhibits binding of LDL to its receptor [42]. Ligand blots were conducted using VLDL and LDL that had been pre-incubated 30 min at room temperature with 0, 1, and 5 μ M B[a]P. LDL bound to the LDL-R or LSR was then detected by anti-apoB antibodies, while VLDL bound to LSR was

detected using either anti-apoB or anti-apoE antibodies. The densities of bands revealing apoB or apoE bound to LSR (Fig. 7A) or LDL-R (Fig. 7B) became less pronounced with increasing concentrations of B[a]P, indicating a decrease in binding between the lipoprotein and LSR or LDL-R. Therefore, these results demonstrate that B[a]P can also directly interfere with the binding of the lipoprotein ligand to its receptor. The addition of 1 μ M B[a]P on LDL and VLDL did not have any effect on their hydrodynamic radius (Supplementary Table S1), nor on protein content, suggesting that this PAH did not change the structure of these lipoproteins. Similarly, incubation with 1 μ M of B[a]P did not significantly change their approximate Zeta potential value (Supplementary Table S1).

Figure 7

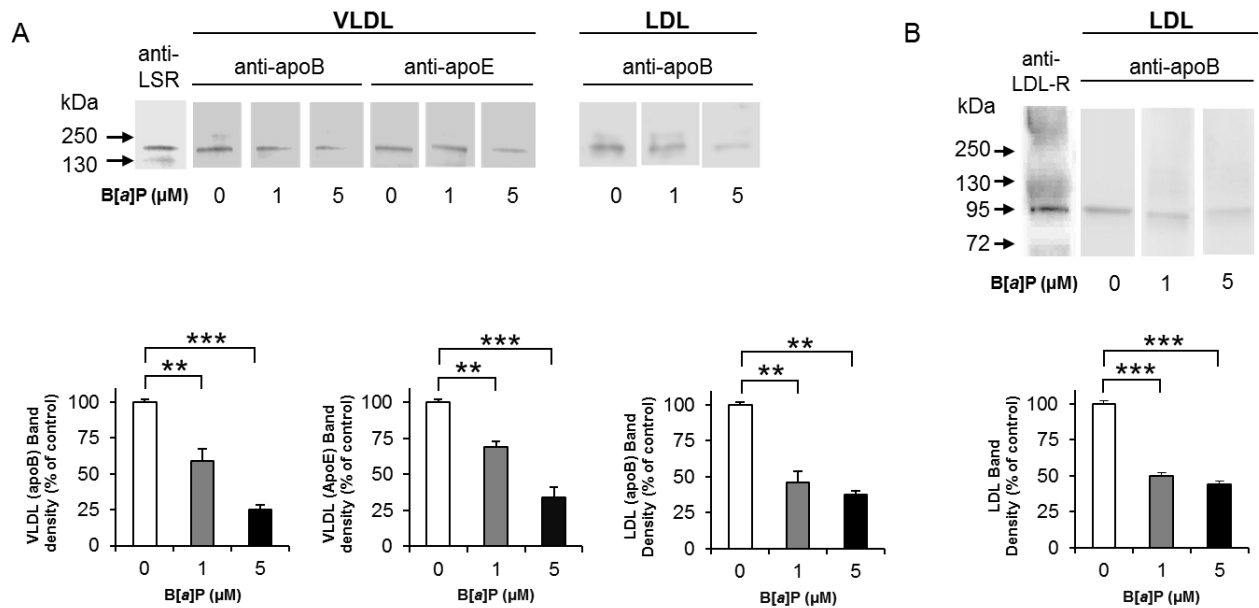


Figure 7. Effect of B[a]P on lipoprotein binding to (A) LSR and (B) LDL-R. Solubilized proteins from rat liver plasma membranes were separated on SDS-PAGE under non-reducing conditions and immobilized onto nitrocellulose membrane. For LSR, nitrocellulose membranes were pre-incubated with 0.8 mM oleate in order to activate the LSR complex. Strips were incubated at 37°C for 1 h with VLDL or LDL pre-incubated with 0, 1, or 5 μM B[a]P. Strips were then washed and immunoblots were performed using anti-apoB or anti-apoE antibodies to identify LDL or VLDL, as indicated. Immunoblots using anti-LSR or anti-LDL-R antibodies were performed to verify the presence of the LSR complex or LDL-R (left strip for A and B, respectively). Densitometric analysis and representative blots are shown here of ligand blots performed on two different preparations of lipoproteins.

DISCUSSION

The objective of this study was to determine the effect of the common PAH pollutant B[a]P on lipid homeostasis in the liver. *In vitro* cell and ligand blot studies showed that B[a]P induced proteasome-mediated degradation of LSR, LDL-R and ABCA1, and also inhibited lipoprotein ligand binding to LSR and LDL-R, all of which could contribute to the changes in lipid status observed in mice exposed to this pollutant. Indeed, repeated treatment of B[a]P *in vivo* resulted in dyslipidemia in the form of increased plasma TC, TG, and TGRL, as well as increased liver TC content, and adipose tissue TG levels, the latter being compatible with the previously reported higher weight gain and fat mass.

Our results show that brief exposure of Hepa1-6 cells to $< 1 \mu\text{M}$ concentrations of B[a]P significantly diminished protein levels of LSR, LDL-R, as well as ABCA1. This effect was not related to a general cell loss since no significant changes were observed in the β -tubulin loading control, nor was cell death observed with the concentrations of the pollutant used (Supplementary Figure S1). Other PAH's including pyrene and phenanthrene did not display any effect on protein levels of LSR, LDL-R or ABCA1 when added to Hepa1-6 cells at similar concentrations, despite similar lipophilicities based on their octanol/water partition coefficients (log Kow for pyrene, 4.50-5.52 and for phenanthrene, 4.28-4.67) to that of B[a]P (log Kow 5.85-6.78) (H. Layeghkhavidaki, *et al*, unpublished data). This would therefore suggest that the B[a]P-induced decrease of these 3 proteins is specific to this pollutant. B[a]P has been shown to induce DNA adduct formation, however, only after prolonged incubations of at least 24 h [43, 44], while here, we used incubation times for ≤ 2 h, and with concentrations as low as 0.1 μM , 20-fold lower than those used for studies related to its carcinogenic properties [43, 44]. Furthermore, in the *in vivo* study, mice were exposed to concentrations of the pollutant that were 100-fold lower than those used to induce a tumorigenic response [45]. It is difficult to know precisely the levels of B[a]P to which individuals are exposed. This is a common pollutant

formed by incomplete combustion of organic material, and can be inhaled, absorbed through the skin, and ingested. In the general population, different PAH levels range between 0.001 to 10 ng/mL [46]. In this study, the concentrations of B[a]P measured in plasma at the time of tissue sampling was measured at 0.69 ng/mL; this value was in the similar range as those found previously in plasma (0.04-1.62 ng/mL) from individuals in which this pollutant was found to be correlated to body mass index [19].

With regard to B[a]P metabolites, their toxico-kinetics in animal system are nowadays well established [47]. For instance, relative short half-lives (7.6 h to 9.2 h) have been described for 3-OH-B[a]P (which is often used as biomarker for assessing B[a]P exposure) following a single intravenous administration of B[a]P at 0.01 mg/kg and 0.05 mg/kg in rats [48]. The low level of rat exposure (0.5 mg/kg body weight of B[a]P every 48 h for 15 days) associated with the relative short half-lives of its metabolites may therefore explain why the concentration levels of all the metabolites analyzed 24 h after the last B[a]P administration were below the limit of quantification of the method used. Further studies would be needed to determine if metabolites of B[a]P and other PAH could exert similar effects.

Cell studies performed here showed that the proteasome was involved in the catabolism of LSR, LDL-R and ABCA1 in Hepa1-6 cells. This is actually the first evidence for proteasome degradation of LSR; proteasome involvement in the LDL-R and ABCA1 removal is consistent with previous work showing that the proteasome pathway can participate in part to the removal LDL-R and ABCA1 in HepG2 and macrophages, respectively [49, 50]. The more recently characterized PCSK9-mediated removal of LDL-R has also been shown to rely on the proteasome, but this may be cell-type dependent [51, 52]. Indeed, the lactacystin-induced increase of LDL-R appeared somewhat less pronounced as compared to that of LSR and ABCA1. B[a]P-induced reduction of the levels of these three proteins was practically abolished in the presence of the proteasome inhibitor, lactacystin, but not in the presence of the lysosomal

inhibitor chloroquine, pointing towards proteasome-mediated removal as the mechanism underlying the effect of B[a]P. A previous observation showing that PAHs including B[a]P increase ubiquitylation of p21 protein in the A549 lung cancer cell line [53] lead us to suggest ubiquitylation as a potential mechanism by which this pollutant increased proteasomal degradation of the three proteins studied here. Additional investigation is required to determine if this represents increased degradation of newly-synthesized LSR or LDL-R, or vesicular LSR or LDL-R as a result of endocytosis from the plasma membrane.

Ligand blots using constant amounts of lipoprotein receptor revealed that the ability of lipoproteins exposed to B[a]P to bind LSR or LDL-R was significantly diminished. In a study in which B[a]P was added to plasma, apoB was found to be the major carrier of this pollutant [54]. LDL contains one apoB per particle, which is the apolipoprotein that is recognized by LDL-R or LSR. The presence of B[a]P on this apoB-containing lipoprotein could therefore interfere with the ability of LDL-R or LSR to recognize the binding epitope(s) of apoB, which may explain the observed decrease in binding. A similar effect could also explain the lower binding of VLDL to LSR. Binding of the apoE component of VLDL to LSR was also affected by B[a]P treatment, which may be due to direct interference in the binding of apoE to LSR, or simply to the indirect effect of reduced apoB-mediated binding of VLDL to LSR, since VLDL particles are large TGRL that contain both apoB and apoE. However, incubation of VLDL or LDL with 1 μ M B[a]P did not lead to significant changes of the hydrodynamic radius and the approximate Zeta potential values obtained by dynamic light scattering and electrophoretic mobility measurements (Supplementary Table S1), suggesting that B[a]P was adsorbed by hydrophobic interaction with the lipid component of the lipoproteins. Further biochemical studies are needed using purified receptor to determine the mechanisms by which this pollutant interferes with binding of the lipoproteins to these receptors.

We are unable to explain the differences in results for mRNA levels in the cell culture and animal studies. Despite this, the results based on cell culture and ligand blot studies obtained *in vitro* could provide a possible explanation for the changes in hepatic lipid metabolism reported in the *in vivo* experiments. In the liver of B[a]P-treated animals, LDL-R protein levels were significantly decreased, which may be due in part to a direct effect of the pollutant based on the cell culture studies, and/or as a result of the increase, albeit modest, in hepatic cholesterol content. Indeed, cholesterol acts as a sensor in the liver through the sterol regulatory element-binding protein pathway, which regulates hepatic needs for exogenous cholesterol by regulating LDL-R expression [55]. Since the absence of LDL-R expression is associated with increased plasma cholesterol and LDL [56, 57], the changes in LDL-R protein levels would be consistent with the increased plasma cholesterol measured. Direct interference of B[a]P with LDL binding to the LDL-R, as demonstrated in the ligand blots, also would contribute to increased plasma cholesterol. However, an increase in the plasma LDL fraction was not detectable in lipoprotein profiles obtained after separation by gel filtration, which may be due to the fact that LDL-R protein levels were reduced, and not completely absent.

ABCA1 was significantly diminished in the presence of B[a]P, in both the cell and animal studies. Indeed, this protein belongs to the family of multi-resistance drug transporters, which have been shown to be modulated through xenobiotic effects of B[a]P [32]. A previous study reported that B[a]P induced expression of ABCG1 after a 3-day exposure of Caco2 cells [58], however they used 50-fold higher concentrations than those used in this study with Hepa1-6 cells. Since ABCA1 plays a role in cholesterol efflux by providing cholesterol to lipid-poor apoA-I for secretion in the form of HDL, its reduced levels in B[a]P-treated mice may contribute to the observed increase in hepatic TC content. Indeed, significant negative

correlations were observed between liver TC/PL ratio and ABCA1, but only in animals treated with B[a]P, and not in controls. A similar negative correlation was also observed between liver TG/PL ratio and ABCA1. A previous study showing that low ABCA1 levels are associated with non-alcoholic steatohepatitis and that siRNA-mediated knock-down of hepatic ABCA1 can lead to TG accumulation in the liver [59] would therefore be consistent with the negative correlations observed between liver lipid levels and ABCA1 in the B[a]P-treated mice.

The *in vitro* study suggests that B[a]P increased proteasome-mediated degradation of LSR. However, no significant changes were observed in hepatic LSR protein levels of B[a]P-treated mice. The fact that decreases in LDL-R and ABCA1 were nevertheless observed in B[a]P-treated mice suggests that LSR turnover rates may be different as compared to these other proteins; however, this remains to be verified. Ligand blots did demonstrate that B[a]P interferes with binding of VLDL and LDL to LSR. Since hepatic LSR is a receptor that plays a significant role in the removal of TGRL during the postprandial phase [6, 8], and taking into account that mice were injected with B[a]P during the postprandial period, this could explain the observed increase in plasma TG and TGRL. Indeed, radioactively-labelled B[a]P associated with chylomicrons is transported directly to the liver to be removed from the circulation [28]. We would therefore postulate that B[a]P-mediated inhibition of binding of TGRL to LSR at the site of the liver could contribute to the observed increase of TGRL in the circulation of B[a]P-treated mice.

Correlational studies revealed a strong positive correlation between LSR and the LDL-R, but only in the control group, which is consistent with a potential cooperativity between LSR and LDL-R regarding the removal of TGRL [8]. Interestingly, this correlation was no longer evident in B[a]P-treated mice. Furthermore, rather strong negative correlations were revealed between

LSR and liver TG/PL, and between LDL-R and liver TC/PL, but only in the B[a]P group of mice. While this type of analysis cannot reveal causal relationships, it nevertheless supports the notion that B[a]P exposure can disrupt normal lipid homeostasis.

This study represents the first report on the direct effect of B[a]P on the hepatic lipoprotein receptors LDL-R and LSR. Increased plasma lipids have been shown in LSR^{+/-} mice [8] as well as in siRNA-mediated liver-specific inactivation of LSR mRNA [6], and in LDL-R^{-/-} mice [56, 57]. Interestingly, LSR^{+/-} exhibited higher weight gain as compared to controls with age, or if placed on a high-fat diet [10]. In addition, LDL-R^{-/-} mice placed on a high-fat and high-carbohydrate diet gained more weight as compared to controls [9]. This leads us to suggest that in a similar manner, B[a]P exposure *in vivo* leads to reduced functional LSR and LDL-R, which contribute to the changes in lipid status, as well as to increased susceptibility towards increased weight gain. Interestingly, we observed that levels of other hepatic proteins involved in cholesterol transport, SR-BI and ABCG1 were decreased in B[a]P –treated mice. On the contrary, protein levels of hepatic ACAT1 and ACAT2 involved in the synthesis of cholesteryl esters were actually increased, which may have contributed to the increased hepatic TC content observed in the mice exposed to this pollutant. These results would support the idea that besides LSR, LDL-R and ABCA1, other proteins involved in hepatic lipid and lipoprotein metabolism may also be affected by B[a]P and other pollutants. Additional studies are needed to explore the underlying molecular mechanisms. We have previously observed that B[a]P directly affects the ability of the adipocyte to release fatty acids after stimulation by adrenaline [20]. We have now shown in this study that this pollutant also contributes towards disrupting lipid homeostasis in the liver leading to dyslipidemia, thus revealing potential mechanisms that could explain part of the contribution of pollutants such as B[a]P to the etiology of dyslipidemia-linked obesity.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr. Henri Schroeder for providing the rats and Dr. Nazir Ahmad for the preparation of rat liver plasma membranes.

REFERENCES

1. Caballero B (2007) The global epidemic of obesity: an overview. *Epidemiol Rev* 29: 1-5.
2. Cunningham E (2010) Where can I find obesity statistics? *J Am Diet Assoc* 110: 656.
3. Howard BV, Ruotolo G, Robbins DC (2003) Obesity and dyslipidemia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 32: 855-867.
4. Eckel RH (2011) The complex metabolic mechanisms relating obesity to hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 1946-1948.
5. Brown MS, Goldstein JL (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232: 34-47.
6. Narvekar P, Berriel Diaz M, Kronen-Herzig A, Hardeland U, Strzoda D, *et al.* (2009) Liver-specific loss of lipolysis-stimulated lipoprotein receptor triggers systemic hyperlipidemia in mice. *Diabetes* 58: 1040-1049.
7. Stenger C, Corbier C, Yen FT (2012) Structure and function of the lipolysis stimulated lipoprotein receptor. In: D. Ekinici, editor editors. *Chemical Biology*. Rijeka: InTech. pp. 267-292.
8. Yen FT, Roitel O, Bonnard L, Notet V, Pratte D, *et al.* (2008) Lipolysis stimulated lipoprotein receptor: a novel molecular link between hyperlipidemia, weight gain, and atherosclerosis in mice. *J Biol Chem* 283: 25650-25659.
9. Schreyer SA, Vick C, Lystig TC, Mystkowski P, LeBoeuf RC (2002) LDL receptor but not apolipoprotein E deficiency increases diet-induced obesity and diabetes in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E207-214.
10. Stenger C, Hanse M, Pratte D, Mbala ML, Akbar S, *et al.* (2010) Up-regulation of hepatic lipolysis stimulated lipoprotein receptor by leptin: a potential lever for controlling lipid clearance during the postprandial phase. *Faseb J* 24: 4218-4228.

11. Heindel JJ, vom Saal FS (2009) Role of nutrition and environmental endocrine disrupting chemicals during the perinatal period on the aetiology of obesity. *Mol Cell Endocrinol* 304: 90-96.
12. Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ (2011) Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol* 127: 204-215.
13. Hao C, Cheng X, Xia H, Ma X (2012) The endocrine disruptor mono-(2-ethylhexyl) phthalate promotes adipocyte differentiation and induces obesity in mice. *Biosci Rep* 32: 619-629.
14. Sargis RM, Johnson DN, Choudhury RA, Brady MJ (2010) Environmental endocrine disruptors promote adipogenesis in the 3T3-L1 cell line through glucocorticoid receptor activation. *Obesity (Silver Spring)* 18: 1283-1288.
15. Bostrom CE, Gerde P, Hanberg A, Jernstrom B, Johansson C, *et al.* (2002) Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 3: 451-488.
16. Brevik A, Lindeman B, Rusnakova V, Olsen AK, Brunborg G, *et al.* (2012) Paternal benzo[a]pyrene exposure affects gene expression in the early developing mouse embryo. *Toxicol Sci* 129: 157-165.
17. Palanikumar L, Kumaraguru AK, Ramakritinan CM, Anand M (2011) Biochemical response of anthracene and benzo [a] pyrene in milkfish *Chanos chanos*. *Ecotoxicol Environ Saf* 75: 187-197.
18. EFSA (2008) Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on polycyclic aromatic hydrocarbons in food. *The EFSA Journal* 724: 1-114.
19. Hutcheon DE, Kantrowitz J, Van Gelder RN, Flynn E (1983) Factors affecting plasma benzo[a]pyrene levels in environmental studies. *Environ Res* 32: 104-110.

20. Irigaray P, Ogier V, Jacquenet S, Notet V, Sibille P, *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: 1362-1372.
21. Boysen G, Hecht SS (2003) Analysis of DNA and protein adducts of benzo[a]pyrene in human tissues using structure-specific methods. *Mutat Res* 543: 17-30.
22. Ekstrom G, von Bahr C, Glaumann H, Ingelman-Sundberg M (1982) Interindividual variation in benzo(a)pyrene metabolism and composition of isoenzymes of cytochrome P-450 as revealed by SDS-gel electrophoresis of human liver microsomal fractions. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 50: 251-260.
23. Mitchell CE, Fischer JP, Dahl AR (1987) Differential induction of cytochrome P-450 catalyzed activities by polychlorinated biphenyls and benzo [a]pyrene in B6C3F1 mouse liver and lung. *Toxicology* 43: 315-323.
24. Fujisawa-Sehara A, Yamane M, Fujii-Kuriyama Y (1988) A DNA-binding factor specific for xenobiotic responsive elements of P-450c gene exists as a cryptic form in cytoplasm: its possible translocation to nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 5859-5863.
25. Schmidt JV, Bradfield CA (1996) Ah receptor signaling pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 55-89.
26. Shimizu Y, Nakatsuru Y, Ichinose M, Takahashi Y, Kume H, *et al.* (2000) Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 779-782.
27. Busbee DL, Norman JO, Ziprin RL (1990) Comparative uptake, vascular transport, and cellular internalization of aflatoxin-B1 and benzo(a)pyrene. *Arch Toxicol* 64: 285-290.
28. Vauhkonen M, Kuusi T, Kinnunen PK (1980) Serum and tissue distribution of benzol[a]pyrene from intravenously injected chylomicrons in rat in vivo. *Cancer Lett* 11: 113-119.

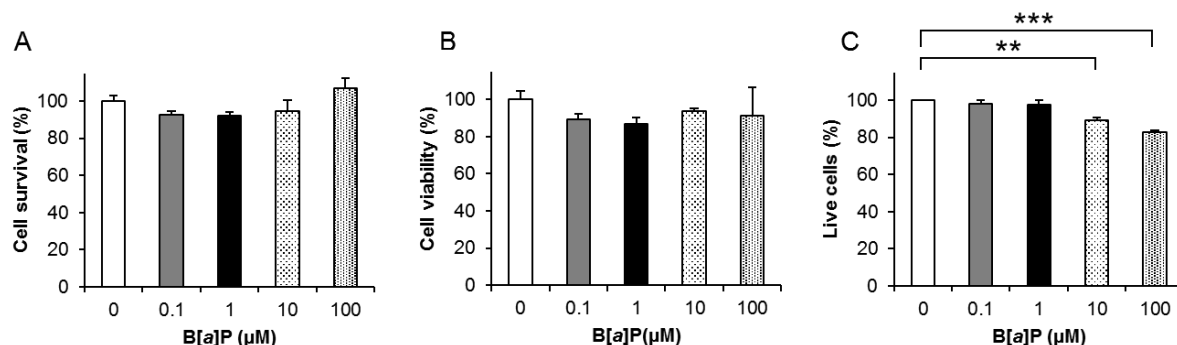
29. Sureau F, Chinsky L, Duquesne M, Laigle A, Turpin PY, *et al.* (1990) Microspectrofluorimetric study of the kinetics of cellular uptake and metabolization of benzo(a)pyrene in human T 47D mammary tumor cells: evidence for cytochrome P1450 induction. *Eur Biophys J* 18: 301-307.
30. Verma N, Pink M, Petrat F, Rettenmeier AW, Schmitz-Spanke S (2012) Exposure of primary porcine urothelial cells to benzo(a)pyrene: in vitro uptake, intracellular concentration, and biological response. *Arch Toxicol* 86: 1861-1871.
31. Kelman BJ, Springer DL (1982) Movements of benzo[a]pyrene across the hemochorial placenta of the guinea pig. *Proc Soc Exp Biol Med* 169: 58-62.
32. Sarkadi B, Homolya L, Szakacs G, Varadi A (2006) Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system. *Physiol Rev* 86: 1179-1236.
33. Sieuwerts AM, Klijn JG, Peters HA, Foekens JA (1995) The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 33: 813-823.
34. Bratosin D, Mitrofan L, Palii C, Estaquier J, Montreuil J (2005) Novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging. *Cytometry A* 66: 78-84.
35. Mann CJ, Khallou J, Chevreuil O, Troussard AA, Guermani LM, *et al.* (1995) Mechanism of activation and functional significance of the lipolysis-stimulated receptor. Evidence for a role as chylomicron remnant receptor. *Biochemistry* 34: 10421-10431.
36. Ahmad N, Girardet JM, Akbar S, Lanhers MC, Paris C, *et al.* (2012) Lactoferrin and its hydrolysate bind directly to the oleate-activated form of the lipolysis stimulated lipoprotein receptor. *Febs J* 279: 4361-4373.

37. Daniel TO, Schneider WJ, Goldstein JL, Brown MS (1983) Visualization of lipoprotein receptors by ligand blotting. *J Biol Chem* 258: 4606-4611.
38. Peiffer J, Cosnier F, Grova N, Nunge H, Salquère G, *et al.* (2013) Neurobehavioral toxicity of a repeated exposure (14 days) to the airborne polycyclic aromatic hydrocarbon fluorene in adult Wistar male rats. *PLoS One* 8: e71413.
39. Grova N, Salquère G, Schroeder H, Appenzeller BM (2011) Determination of PAHs and OH-PAHs in rat brain by gas chromatography tandem (triple quadrupole) mass spectrometry. *Chem Res Toxicol* 24: 1653-1667.
40. Yen FT, Masson M, Clossais-Besnard N, Andre P, Grosset JM, *et al.* (1999) Molecular cloning of a lipolysis-stimulated remnant receptor expressed in the liver. *J Biol Chem* 274: 13390-13398.
41. Bihain BE, Yen FT (1992) Free fatty acids activate a high-affinity saturable pathway for degradation of low-density lipoproteins in fibroblasts from a subject homozygous for familial hypercholesterolemia. *Biochemistry* 31: 4628-4636.
42. Bihain BE, Deckelbaum RJ, Yen FT, Gleeson AM, Carpentier YA, *et al.* (1989) Unesterified fatty acids inhibit the binding of low density lipoproteins to the human fibroblast low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 264: 17316-17321.
43. Huang M, Blair IA, Penning TM (2013) Identification of stable benzo[a]pyrene-7,8-dione-DNA adducts in human lung cells. *Chem Res Toxicol* 26: 685-692.
44. Pruess-Schwartz D, Baird WM, Nikbakht A, Merrick BA, Selkirk JK (1986) Benzo(a)pyrene:DNA adduct formation in normal human mammary epithelial cell cultures and the human mammary carcinoma T47D cell line. *Cancer Res* 46: 2697-2702.
45. Wu K, Shan YJ, Zhao Y, Yu JW, Liu BH (2001) Inhibitory effects of RRR- α -tocopheryl succinate on benzo(a)pyrene (B(a)P)-induced forestomach carcinogenesis in female mice. *World J Gastroenterol* 7: 60-65.

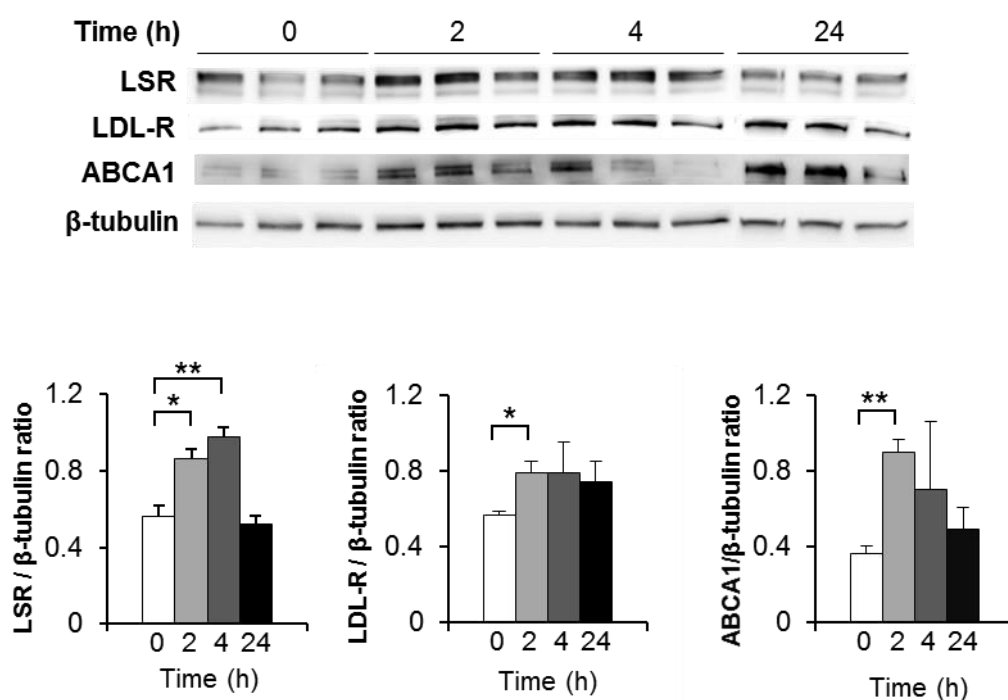
46. Pleil JD, Stiegel MA, Sobus JR, Tabucchi S, Ghio AJ, *et al.* (2010) Cumulative exposure assessment for trace-level polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using human blood and plasma analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 878: 1753-1760.
47. Chien YC, Yeh CT (2012) Excretion kinetics of urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene following dietary exposure to benzo[a]pyrene in humans. *Arch Toxicol* 86: 45-53.
48. Payan JP, Lafontaine M, Simon P, Marquet F, Champmargin-Gendre C, *et al.* (2009) 3-Hydroxybenzo(a)pyrene as a biomarker of dermal exposure to benzo(a)pyrene. *Arch Toxicol* 83: 873-883.
49. Miura H, Tomoda H, Miura K, Takishima K, Omura S (1996) Lactacystin increases LDL receptor level on HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 227: 684-687.
50. Ogura M, Ayaori M, Terao Y, Hisada T, Iizuka M, *et al.* (2011) Proteasomal inhibition promotes ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) and ABCG1 expression and cholesterol efflux from macrophages in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 1980-1987.
51. Chen Y, Wang H, Yu L, Yu X, Qian YW, *et al.* (2011) Role of ubiquitination in PCSK9-mediated low-density lipoprotein receptor degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 415: 515-518.
52. Wang Y, Huang Y, Hobbs HH, Cohen JC (2012) Molecular characterization of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9-mediated degradation of the LDLR. *J Lipid Res* 53: 1932-1943.
53. Nakanishi Y, Pei XH, Takayama K, Bai F, Izumi M, *et al.* (2000) Polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogens increase ubiquitination of p21 protein after the stabilization of p53 and the expression of p21. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22: 747-754.

54. Polyakov LM, Chasovskikh MI, Panin LE (1996) Binding and transport of benzo[a]pyrene by blood plasma lipoproteins: the possible role of apolipoprotein B in this process. *Bioconjug Chem* 7: 396-400.
55. Brown MS, Goldstein JL (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89: 331-340.
56. de Faria E, Fong LG, Komaromy M, Cooper AD (1996) Relative roles of the LDL receptor, the LDL receptor-like protein, and hepatic lipase in chylomicron remnant removal by the liver. *J Lipid Res* 37: 197-209.
57. Ishibashi S, Perrey S, Chen Z, Osuga J, Shimada M, *et al.* (1996) Role of the low density lipoprotein (LDL) receptor pathway in the metabolism of chylomicron remnants. A quantitative study in knockout mice lacking the LDL receptor, apolipoprotein E, or both. *J Biol Chem* 271: 22422-22427.
58. Ebert B, Seidel A, Lampen A (2005) Identification of BCRP as transporter of benzo[a]pyrene conjugates metabolically formed in Caco-2 cells and its induction by Ah-receptor agonists. *Carcinogenesis* 26: 1754-1763.
59. Yang Y, Jiang Y, Wang Y, An W (2010) Suppression of ABCA1 by unsaturated fatty acids leads to lipid accumulation in HepG2 cells. *Biochimie* 92: 958-963.

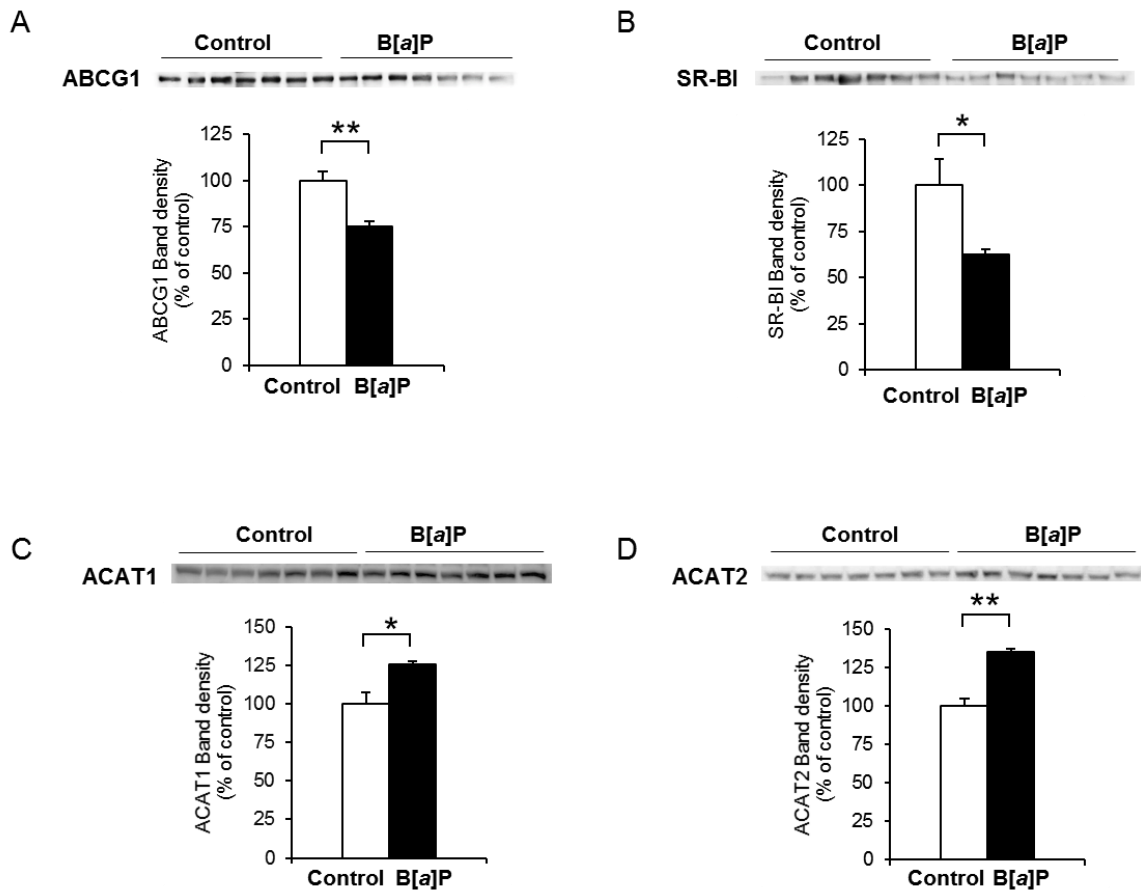
Supporting Information



Supplementary Figure S1. Effect of B[a]P on cell viability. Hepa1-6 cells were incubated at 37°C for 1 h with the indicated concentrations of B[a]P. Cell viability and metabolic activity tests were performed using (A) MTT, (B) calcein, and (C) trypan blue exclusion assays, as described in Materials and Methods. Results are shown as mean \pm SEM of triplicate determinations.



Supplementary Figure S2. Time course effect of lactacystin on LSR, LDL-R and ABCA1 protein levels in Hepa1-6 cells. Hepa1-6 cells were incubated at 37°C with 10 μM lactacystin for the indicated times. Immunoblots and densitometric analyses of the signal as a ratio to that of β -tubulin are shown for LSR, LDL-R and ABCA1 (* P <0.03, ** P <0.01, compared to time 0, $n=3$ per treatment).



Supplementary Figure S3. Effect of B[a]P treatment on hepatic protein levels of ABCG1, SR-BI, ACAT1 and ACAT2. Immunoblots were performed to detect A) ABCG1, B) SR-BI, C) ACAT1 and D) ACAT2 protein levels in membrane (SR-BI) or cytosolic (ABCG1, ACAT1, ACAT2) fractions prepared from liver homogenates from mice treated with or without B[a]P. Densitometric analyses were performed, and are shown here as means \pm SEM of $n = 7$ per group. Student's t-test was used to determine statistical difference (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) as compared to control values.

Supplementary Table 1. Effect of B[a]P on the hydrodynamic radius and on Zeta potential of LDL and VLDL.

Benzopyrene (μM)	LDL			VLDL		
	Z-average R_h (nm)	PdI width (nm)	Approx. ζ (mV)	Z-average R_h (nm)	PdI width (nm)	Approx. ζ (mV)
0	12.3	5.3	-28.6 ± 6.5	32.8	15.9	-28.0 ± 13.0
1	12.4	5.3	-28.0 ± 5.5	32.9	16.3	-28.5 ± 10.2

VLDL and LDL were incubated with B[a]P as described for Figure 7 and measurements were made as described in Materials and Methods. Protein concentrations of VLDL and LDL before and after incubation with B[a]P were not significantly different. (R_h : hydrodynamic radius; PdI: Polydispersity Index; Approx. ζ : Approximate Zeta potential).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Conclusions

Le maintien de l'homéostasie lipidique est un phénomène complexe qui constitue un enjeu important en termes de santé publique, puisque sa dérégulation (taux élevés de triglycérides ou de cholestérol dans les VLDL ou les LDL, quantité insuffisante de HDL) représente un facteur de risque important pour les pathologies liées au vieillissement : maladies cardiovasculaires, métaboliques et neurodégénératives. Parmi les facteurs qui régulent l'homéostasie lipidique, le foie joue un rôle important par la capture de lipides sous forme de lipoprotéines et leur redistribution aux tissus périphériques.

L'objectif de ce travail était de rechercher si des POP de type HAP comme le B[a]P, le pyrène et le phénanthrène pouvaient exercer une action potentielle sur le métabolisme lipidique et ses acteurs, en particulier au niveau du foie, et le cas échéant, d'étudier les mécanismes impliqués. Comme le LSR participe activement à l'élimination des particules lipidiques sous forme de lipoprotéines telles que les résidus de chylomicrons pendant la phase post-prandiale, et que le LDL-R et l'ABCA1 sont impliqués dans le métabolisme de cholestérol, nous avons recherché si le B[a]P, le pyrène ou le phénanthrène affectaient l'expression et / ou de l'activité de ces protéines en utilisant des approches *in vitro* et *in vivo*.

Si les études *in vitro* sur les cellules Hepa1-6 n'ont pas révélé d'effet du pyrène et du phénanthrène sur l'expression ou l'activité de ces protéines, nous avons montré au cours de cette étude que le B[a]P diminuait le taux d'expression du LSR, du LDL-R et de l'ABCA1, ainsi que l'activité du LSR et du LDL-R. Ces 3 HAP ayant de propriétés physico-chimiques proches, notamment en termes de lipophilie, les effets que nous avons mis en évidence sont donc bien spécifiques au B[a]P et à son métabolisme, et non pas directement liés aux propriétés physico-chimiques des composés. Afin de connaître les mécanismes impliqués, nous avons utilisé un inhibiteur de protéasome, la lactacystine et un inhibiteur de lysosome, la chloroquine. Ceci nous a permis de montrer pour la première fois que le LSR était dégradé par la voie du protéasome. Nous avons également mis en évidence le fait que la lactacystine diminuait les effets du BAP sur le taux d'expression protéique de LSR, LDL- et ABCA1, ce qui suggère fortement que le B[a]P entraîne une augmentation de la dégradation de ces protéines par la voie du protéasome, aucun effet n'ayant été observé par ailleurs pour la voie lysosomale.

Nos études *in vivo* relatives à l'injection de B[a]P (0,5 mg/Kg de poids corporel/48 h, soit 100-fois inférieures à celles utilisées pour induire une réponse tumorigène, (Huang *et al.*, 2013) par

voie *i.p.* à des souris pendant deux semaines ont montré une prise de poids corporel accompagnée d'une augmentation du taux de triglycérides et de cholestérol total plasmatiques. Ce phénomène s'accompagne d'une augmentation du contenu en triglycérides du tissu adipeux et d'une augmentation du cholestérol total dans les tissus adipeux et hépatiques.

Les résultats obtenus *in vivo* sont en accord avec ceux obtenus lors des expériences de culture cellulaire. En effet, le taux de protéine LDL-R est significativement diminué dans le foie des animaux traités par le B[a]P, ce qui peut être dû à un effet direct du polluant (comme cela l'a été observé lors des tests d'incubation des cultures cellulaires avec le B[a]P), et/ou à la conséquence de l'augmentation, quoique modeste, de la teneur en cholestérol hépatique. Etant donné que l'absence d'expression du LDL-R est associée à une augmentation de cholestérol et de LDL plasmatiques (Brown and Goldstein, 1986; Wang *et al.*, 2012), la diminution d'expression du LDL-R est aussi compatible avec un taux de cholestérol plasmatique accru. De plus, l'interférence directe du B[a]P avec la fixation des LDL au LDL-R, comme nous l'avons démontré lors des expériences de ligands-blots, contribue aussi probablement à une augmentation du taux de cholestérol plasmatique.

Les changements de concentration de cholestérol plasmatique et hépatique des souris traitées avec du B[a]P nous ont aussi permis de d'établir que le taux d'expression protéique d'ABCA1 était significativement diminué en présence de B[a]P. En effet, cette protéine appartient à la famille de la *multi-resistance drug transporters*, qui sont modulés par des effets xénobiotiques du B[a]P (Busbee *et al.*, 1990). Une étude antérieure avait déjà établi que le B[a]P induisait l'expression d'ABCG1 après 3 jours d'exposition de cellules Caco2 (Polyakov *et al.*, 1996), mais les concentrations utilisées étaient 50 fois plus élevées que dans notre étude. Comme ABCA1 joue un rôle dans l'efflux de cholestérol en fournissant le cholestérol aux l'apoA-I pour la sécrétion de HDL, des taux réduits de ce transporteur chez les souris traitées par le B[a]P peuvent contribuer à l'augmentation de la teneur en cholestérol total hépatique. En effet, des corrélations négatives significatives ont été observées entre le rapport TC/ PL de foie et ABCA1, mais seulement chez les animaux traités par le B[a]P. Une corrélation négative similaire a également été observée entre le rapport TG / PL et ABCA1 au niveau hépatique, ce qui est cohérent avec des études antérieures montrant que le knock-down de l'ABCA1 hépatique par une stratégie siRNA pouvait conduire à l'accumulation TG dans le foie, et que des niveaux faibles d'ABCA1 étaient associés à la stéatose hépatique non alcoolique (Yang *et al.*, 2010). Nous avons également observé que les taux d'autres protéines hépatiques impliqués

dans le transport du cholestérol, SR-BI et ABCG1, étaient diminués chez les souris traitées au B[a]P, alors que les taux de protéines ACAT1 et ACAT2 hépatiques impliquées dans la synthèse d'esters de cholestérol sont augmentés, ce qui peut également contribuer à la teneur en TC hépatique accrue observée chez les souris exposées à ce polluant.

Bien que l'étude *in vitro* nous ait permis de conclure que le B[a]P augmentait la dégradation du LSR par le protéasome, aucun changement significatif n'a été observé dans les taux hépatiques de protéine LSR chez les souris ayant reçu un traitement au B[a]P. Le fait qu'une diminution de LDL-R et ABCA1 ait cependant été observée chez les souris traitées au B[a]P suggère que le *turnover* du LSR pourrait être différent de celui des deux autres protéines.

Nos études d'immunofluorescence et de *ligand-blots* ont montré que le B[a]P interférait avec la fixation des lipoprotéines sur le LSR et le LDL-R. Comme le LSR est le récepteur majeur impliqué dans l'élimination des TGRL pendant la phase post-prandiale (Yen *et al.*, 2008; Narvekar *et al.*, 2009), cette baisse d'affinité pourrait expliquer l'augmentation du taux de TG aussi bien dans le plasma que dans les TGRL. En effet, Sureau *et al.* (1990) ont montré que du B[a]P marqué était associé aux chylomicrons et transporté dans le foie au niveau du site de catabolisme de ces TGRL (Sureau *et al.*, 1990). Nous pouvons donc postuler que l'inhibition de la fixation des TGRL au LSR lors du traitement par le B[a]P pourrait contribuer à l'augmentation des TGRL chez les souris traitées.

Nous avons mis en évidence une forte corrélation positive entre les taux de LSR et de LDL-R, mais seulement dans le groupe témoin, ce qui est cohérent avec une potentielle coopérativité entre ces deux récepteurs pour l'élimination des TGRL (Yen *et al.*, 2008). En outre, de fortes corrélations négatives ont été mises en évidence entre les taux de LSR et le rapport TG / PL de foie, et entre LDL-R et le rapport TC / PL de foie, mais uniquement dans le groupe de souris traitées. Bien que ce type d'analyse ne puisse pas révéler de relations causales, il soutient néanmoins l'idée que l'exposition au B[a]P puisse perturber l'homéostasie lipidique.

En résumé, au cours de cette étude, nous avons montré que le traitement par voie *i.p.* de souris par du B[a]P conduisait à une perturbation de l'homéostasie lipidique, associée à une prise de poids chez les animaux et à une diminution de l'expression et de l'activité du LSR, du LDL-R et de l'ABCA1. Nous avons proposé que le B[a]P induise la dégradation de ces protéines par le protéasome, et diminue également l'affinité des lipoprotéines pour les récepteurs LSR et du LDL-R.

Perspectives

Le système d'ubiquitinylation et de dégradation *via* le protéasome est impliqué dans le *turn over* de nombreuses protéines cellulaires. Il est donc possible que l'augmentation de l'activité du protéasome induite par le B[a]P puisse affecter d'autres protéines impliquées dans le métabolisme des lipides et des lipoprotéines. Par exemple, l'ubiquitinylation régule l'endocytose et la dégradation du récepteur de la leptine. Or, l'interaction entre la leptine et son récepteur conduit à une cascade de signalisation importante pour la régulation de l'expression du LSR hépatique, ainsi que pour l'homéostasie du glucose. Des études restent donc nécessaires pour évaluer l'effet du B[a]P sur d'autres protéines importantes pour la régulation de l'homéostasie lipidique, qui pourraient utiliser les approches déjà mises en œuvre au cours de ce travail, mais également s'intéresser au taux d'ubiquitinylation de ces protéines sur les cellules exposées ou non au B[a]P, par double marquage.

En ce qui concerne les acteurs de l'homéostasie lipidique, et en lien direct avec cette étude, il serait également intéressant d'étudier quel impact exerce le traitement au B[a]P sur les lipases (hépatiques, des tissus adipeux et musculaires) et de rechercher si des liens sont perturbés entre le tissu adipeux, musculaire et hépatique. Un effet sur la synthèse/sécrétion des lipoprotéines *via* un changement d'activité des transporteurs ABC pourrait également être recherché et pourrait avoir des conséquences sur l'efflux du cholestérol *via* ces transporteurs. Un effet du B[a]P a été également démontré sur le taux d'expression du récepteur SR-B1 au cours de notre étude. Ce récepteur est fortement impliqué dans l'épuration des lipoprotéines par les macrophages, et donc un acteur important dans la régulation de l'homéostasie lipidique extrahépatique, et plus particulièrement au niveau du système cardiovasculaire. Ce serait intéressant aussi d'étudier si l'activité de ce récepteur et d'autres récepteurs de type « scavenger » est modifiée en présence des polluants, et d'en déterminer l'impact sur le développement de l'athérosclérose.

Enfin, il serait intéressant d'étendre cette étude à d'autres polluants, et à d'autres modes d'administration. En particulier, une étude pourrait être envisagée dans laquelle non pas un seul contaminant, mais un mélange de contaminants serait administré par voie orale. En effet, alors que le *Scientific Committee on Food* (SCF) avait initialement suggéré d'utiliser le B[a]P comme marqueur de la présence des PAH dans l'alimentation, pour en estimer les risques à long terme de ces composés sur la santé humaine. Or, une réévaluation des données par l'EFSA en juin 2007, réactualisée en juin 2008, a établi que le B[a]P n'était détecté que dans 50% des

échantillons. Cependant, 30% des échantillons négatifs pour le B[a]P renferment d'autres HAP carcinogènes et génotoxiques, le chrysène étant le composé le plus représenté, avec un taux de 242 µg/kg. A l'heure actuelle, il semble que la somme des teneurs en B[a]P, chrysène, benz[a]anthracène and benzo[b]fluoranthène (encore appelée PAH4), représente le meilleur compromis pour l'estimation des contaminations en PAH. Une autre étude *in vivo* pourrait être envisagée au cours de laquelle ce mélange de contaminant serait ajouté à la matrice alimentaire de souris pendant plusieurs mois, à des concentrations suffisantes (10 fois le taux de contamination de base par exemple). Ce type d'approche serait plus représentatif des effets des PAH apportés par l'alimentation au cours d'une vie et pourrait apporter une meilleure compréhension de l'influence de la consommation d'aliments contaminés par les HAP sur la disponibilité des lipides pendant la phase postprandiale, ou de façon plus générale sur l'homéostasie lipidique, et fournir des indices pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires induisant les effets obésogènes de ces substances.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abumrad, N.A. (2005). CD36 may determine our desire for dietary fats. *J. Clin. Invest.* *115*, 2965–2967.

Adachi, H. and Tsujimoto, M. (2002). FEEL-1, a novel scavenger receptor with *in vitro* bacteria-binding and angiogenesis-modulating activities. *J. Biol. Chem.* *277*, 34264–34270.

Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H. and Inoue, K. (1997). Expression cloning of a novel scavenger receptor from human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* *272*, 31217–31220.

Agellon, L.B., Toth, M.J. and Thomson, A.B.R. (2002). Intracellular lipid binding proteins of the small intestine. *Mol. Cell. Biochem.* *239*, 79–82.

Ahmad, N., Girardet, J.-M., Akbar, S., Lanhers, M.-C., Paris, C., Yen, F.T. and Corbier, C. (2012). Lactoferrin and its hydrolysate bind directly to the oleate-activated form of the lipolysis stimulated lipoprotein receptor. *FEBS J.* *279*, 4361–4373.

Altmann, S.W., Davis, H.R., Jr, Zhu, L.-J., Yao, X., Hoos, L.M., Tetzloff, G., Iyer, S.P.N., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., Wang, L., Murgolo, N. and Graziano, M.P. (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* *303*, 1201–1204.

Alwaili, K., Alrasadi, K., Awan, Z. and Genest, J. (2009). Approach to the diagnosis and management of lipoprotein disorders. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* *16*, 132–140.

André-Fouët, X., Ben lian, P., Baereziat, G., Bernard, S., and Farnier, M. (2004). Métabolisme des lipides dans l'organisme. Dyslipidémie et Athérogenèse, *In Elsevier*, 30–56.

ATSDR (1995). Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons. Agency Toxic Subst. Dis. Regist. 1–458.

Baillie-Hamilton, P.F. (2002). Chemical toxins: a hypothesis to explain the global obesity epidemic. *J. Altern. Complement. Med. N. Y.* *N 8*, 185–192.

Banks, W.A., Coon, A.B., Robinson, S.M., Moinuddin, A., Shultz, J.M., Nakaoka, R. and Morley, J.E. (2004). Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain barrier. *Diabetes* *53*, 1253–1260.

- Bantle, J.P. (2009). Dietary fructose and metabolic syndrome and diabetes. *J. Nutr.* *139*, 1263–1268.
- De Beer, M.C., Castellani, L.W., Cai, L., Stromberg, A.J., de Beer, F.C. and van der Westhuyzen, D.R. (2004). ApoA-II modulates the association of HDL with class B scavenger receptors SR-BI and CD36. *J. Lipid Res.* *45*, 706–715.
- Beglova, N. and Blacklow, S.C. (2005). The LDL receptor: how acid pulls the trigger. *Trends Biochem. Sci.* *30*, 309–317.
- Bernhard, D., Schwaiger, W., Crazzolaro, R., Tinhofer, I., Kofler, R. and Csordas, A. (2003). Enhanced MTT-reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells. *Cancer Lett.* *195*, 193–199.
- Bhatnagar, D., Soran, H. and Durrington, P.N. (2008). Hypercholesterolaemia and its management. *BMJ* *337*, a993.
- Bihain, B.E. and Yen, F.T. (1992). Free fatty acids activate a high-affinity saturable pathway for degradation of low-density lipoproteins in fibroblasts from a subject homozygous for familial hypercholesterolemia. *Biochemistry* *31*, 4628–4636.
- Biles, J.E., McNeal, T.P., Begley, T.H. and Hollifield, H.C. (1997). Determination of Bisphenol-A in Reusable Polycarbonate Food-Contact Plastics and Migration to Food-Simulating Liquids. *J. Agric. Food Chem.* *45*, 3541–3544.
- Björkhem, I. (2002). Do oxysterols control cholesterol homeostasis? *J. Clin. Invest.* *110*, 725–730.
- Black, D.D. (2007). Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. I. Development of intestinal lipid absorption: cellular events in chylomicron assembly and secretion. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *293*, G519–524.
- Bonnefond, A. and Froguel, P. (2011). Genetics of type 2 diabetes and obesity: Where are we? What can we expect? *Médecine des Maladies Métaboliques.* *5*, 477-478.

- Bonen, A., Han, X.-X., Habets, D.D.J., Febbraio, M., Glatz, J.F.C. and Luiken, J.J.F.P. (2007). A null mutation in skeletal muscle FAT/CD36 reveals its essential role in insulin- and AICAR-stimulated fatty acid metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, E1740–1749.
- Borissoff, J.I., Spronk, H.M.H. and Ten Cate, H. (2011). The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 364, 1746–1760.
- Boström, C.-E., Gerde, P., Hanberg, A., Jernström, B., Johansson, C., Kyrklund, T., Rannug, A., Törnqvist, M., Victorin, K. and Westerholm, R. (2002). Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ. Health Perspect.* 110 Suppl 3, 451–488.
- Boyer, V. (2008) Rapport d'information : conclusion des travaux de la mission sur la prévention de l'obésité. Assemblée Nationale. n°1131, 1-244.
- Boysen, G. and Hecht, S.S. (2003). Analysis of DNA and protein adducts of benzo[a]pyrene in human tissues using structure-specific methods. *Mutat. Res.* 543, 17–30.
- Brabant, G., Müller, G., Horn, R., Anderwald, C., Roden, M. and Nave, H. (2005). Hepatic leptin signaling in obesity. *FASEB J.* 19, 1048–1050.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Breivik, K., Sweetman, A., Pacyna, J.M. and Jones, K.C. (2002). Towards a global historical emission inventory for selected PCB congeners--a mass balance approach. 1. Global production and consumption. *Sci. Total Environ.* 290, 181–198.
- Brevik, A., Lindeman, B., Rusnakova, V., Olsen, A.-K., Brunborg, G. and Duale, N. (2012). Paternal benzo[a]pyrene exposure affects gene expression in the early developing mouse embryo. *Toxicol. Sci.* 129, 157–165.
- Brewer, H.B. Jr (2004). High-density lipoproteins: a new potential therapeutic target for the prevention of cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 387–391.

- Brewster, M.E., Ihm, J., Brainard, J.R. and Harmony, J.A. (1978). Transfer of phosphatidylcholine facilitated by a component of human plasma. *Biochim. Biophys. Acta* 529, 147–159.
- Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1976). Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. *Science* 191, 150–154.
- Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232, 34–47.
- Buhman, K.K., Accad, M., Novak, S., Choi, R.S., Wong, J.S., Hamilton, R.L., Turley, S. and Farese, R.V. Jr (2000). Resistance to diet-induced hypercholesterolemia and gallstone formation in ACAT2-deficient mice. *Nat. Med.* 6, 1341–1347.
- Bultel-Brienne, S., Lestavel, S., Pilon, A., Laffont, I., Tailleux, A., Fruchart, J.-C., Siest, G. and Clavey, V. (2002). Lipid free apolipoprotein E binds to the class B Type I scavenger receptor I (SR-BI) and enhances cholesteryl ester uptake from lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 277, 36092–36099.
- Busbee, D.L., Norman, J.O. and Ziprin, R.L. (1990). Comparative uptake, vascular transport, and cellular internalization of aflatoxin-B1 and benzo(a)pyrene. *Arch. Toxicol.* 64, 285–290.
- Caballero, B. (2007). The global epidemic of obesity: an overview. *Epidemiol. Rev.* 29, 1–5.
- Calafat, A.M., Ye, X., Wong, L.-Y., Reidy, J.A. and Needham, L.L. (2008). Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ. Health Perspect.* 116, 39–44.
- Calegari, L., Gorenstein, C., Gentil, V., Planeta, C.S. and Nunes-de-Souza, R.L. (2007). Effect of chronic treatment with clomipramine on food intake, macronutrient selection and body weight gain in rats. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 1541–1546.
- Calvo, D., Gómez-Coronado, D., Suárez, Y., Lasunción, M.A. and Vega, M.A. (1998). Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J. Lipid Res.* 39, 777–788.

Carrière, V., Vidal, R., Lazou, K., Lacasa, M., Delers, F., Ribeiro, A., Rousset, M., Chambaz, J. and Lacorte, J.M. (2005). HNF-4-dependent induction of apolipoprotein A-IV gene transcription by an apical supply of lipid micelles in intestinal cells. *J. Biol. Chem.* *280*, 5406–5413.

Cavalieri, E.L. and Rogan, E.G. (1992). The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis. The central role of radical cations in metabolic activation. *Pharmacol. Ther.* *55*, 183–199.

Cave, M., Appana, S., Patel, M., Falkner, K.C., McClain, C.J. and Brock, G. (2010). Polychlorinated biphenyls, lead, and mercury are associated with liver disease in American adults: NHANES 2003-2004. *Environ. Health Perspect.* *118*, 1735–1742.

Cawthorn, W.P. and Sethi, J.K. (2008). TNF-alpha and adipocyte biology. *FEBS Lett.* *582*, 117–131.

Celik, L., Davey, J., Lund, D. and Schiøtt, B. (2008). Exploring interactions of endocrine-disrupting compounds with different conformations of the human estrogen receptor alpha ligand binding domain: a molecular docking study. *Chem. Res. Toxicol.* *21*, 2195–2206.

Chan, D.C., Pang, J., Romic, G. and Watts, G.F. (2013). Postprandial hypertriglyceridemia and cardiovascular disease: current and future therapies. *Curr. Atheroscler. Rep.* *15*, 309.

Chen, G.C. and Kane, J.P. (1979). Secondary structure in very low density and intermediate density lipoproteins of human serum. *J. Lipid Res.* *20*, 481–488.

Chen, M., Masaki, T. and Sawamura, T. (2002). LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Pharmacol. Ther.* *95*, 89–100.

Chen, W.J., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1990). NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* *265*, 3116–3123.

CITEPA (2013). Hydrocarbures aromatiques polycycliques-HAP. Rapport Avril 2013.

Collins, S. (2005). Overview of clinical perspectives and mechanisms of obesity. *Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 73, 470–471.

Cooper, A.D., Erickson, S.K., Nutik, R. and Shrewsbury, M.A. (1982). Characterization of chylomicron remnant binding to rat liver membranes. *J. Lipid Res.* 23, 42–52.

Cope, M.B., Nagy, T.R., Fernández, J.R., Geary, N., Casey, D.E. and Allison, D.B. (2005). Antipsychotic drug-induced weight gain: development of an animal model. *Int. J. Obes.* 2005 29, 607–614.

Cornelis, C., D'Hollander, W., Roosens, L., Covaci, A., Smolders, R., Van Den Heuvel, R., Govarts, E., Van Campenhout, K., Reynders, H. and Bervoets, L. (2012). First assessment of population exposure to perfluorinated compounds in Flanders, Belgium. *Chemosphere* 86, 308–314.

Cortner, J.A., Coates, P.M., Bennett, M.J., Cryer, D.R. and Le, N.A. (1991). Familial combined hyperlipidaemia: use of stable isotopes to demonstrate overproduction of very low-density lipoprotein apolipoprotein B by the liver. *J. Inherit. Metab. Dis.* 14, 915–922.

Cummings, R.D., Kornfeld, S., Schneider, W.J., Hobgood, K.K., Tolleshaug, H., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1983). Biosynthesis of N- and O-linked oligosaccharides of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* 258, 15261–15273.

Cunningham, E. (2010). Where can I find obesity statistics? *J. Am. Diet. Assoc.* 110, 656.

D'Arcangelo, G., Homayouni, R., Keshvara, L., Rice, D.S., Sheldon, M. and Curran, T. (1999). Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron* 24, 471–479.

Daniel, T.O., Schneider, W.J., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1983). Visualization of lipoprotein receptors by ligand blotting. *J. Biol. Chem.* 258, 4606–4611.

Davis, C.G., Elhammer, A., Russell, D.W., Schneider, W.J., Kornfeld, S., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1986). Deletion of clustered O-linked carbohydrates does not impair function of low density lipoprotein receptor in transfected fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 261, 2828–2838.

Dawson, R., Jr (1986). Developmental and sex-specific effects of low dose neonatal monosodium glutamate administration on mediobasal hypothalamic chemistry. *Neuroendocrinology* 42, 158–166.

Denison, M.S., Fisher, J.M. and Whitlock, J.P., Jr (1988). The DNA recognition site for the dioxin-Ah receptor complex. Nucleotide sequence and functional analysis. *J. Biol. Chem.* 263, 17221–17224.

Dergunov, A.D. (2004). Apolipoprotein E structure and substrate and receptor-binding activities of triglyceride-rich human plasma lipoproteins in normo- and hypertriglyceridemia. *Biochem. Biokhimiia* 69, 720–737.

Desvergne, B., Feige, J.N. and Casals-Casas, C. (2009). PPAR-mediated activity of phthalates: A link to the obesity epidemic? *Mol. Cell. Endocrinol.* 304, 43–48.

Dhaliwal, B.S. and Steinbrecher, U.P. (1999). Scavenger receptors and oxidized low density lipoproteins. *Clin. Chim. Acta* 286, 191–205.

Diraison, F., Dusserre, E., Vidal, H., Sothier, M. and Beylot, M. (2002). Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282, E46–51.

Doi, T., Higashino, K., Kurihara, Y., Wada, Y., Miyazaki, T., Nakamura, H., Uesugi, S., Imanishi, T., Kawabe, Y. and Itakura, H. (1993). Charged collagen structure mediates the recognition of negatively charged macromolecules by macrophage scavenger receptors. *J. Biol. Chem.* 268, 2126–2133.

Domingo, J.L. (2012). Polybrominated diphenyl ethers in food and human dietary exposure: a review of the recent scientific literature. *Food Chem. Toxicol.* 50, 238–249.

Drover, V.A., Ajmal, M., Nassir, F., Davidson, N.O., Nauli, A.M., Sahoo, D., Tso, P. and Abumrad, N.A. (2005). CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood. *J. Clin. Invest.* 115, 1290–1297.

Eaton, C.B. (2005). Hyperlipidemia. *Prim. Care* 32, 1027–1055, Canton-Potsdam Hospital, chapitre VIII.

Eaton, R.P. and Kipnis, D.M. (1969). Radioimmunoassay of beta lipoprotein-protein of rat serum. *J. Clin. Invest.* 48, 1387–1396.

Edwards, J.R. and Prozialeck, W.C. (2009). Cadmium, diabetes and chronic kidney disease. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 289–293.

Ekström, G., von Bahr, C., Glaumann, H. and Ingelman-Sundberg, M. (1982). Interindividual variation in benzo(a)pyrene metabolism and composition of isoenzymes of cytochrome P-450 as revealed by SDS-gel electrophoresis of human liver microsomal fractions. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh.)* 50, 251–260.

Enesco, M. and Leblond, C.P. (1962). Increase in Cell Number as a Factor in the Growth of the Organs and Tissues of the Young Male Rat. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 10, 530–562.

Es-Saady, D., Simon, A., Jayat-Vignoles, C., Chulia, A.J. and Delage, C. (1996). MCF-7 cell cycle arrested at G1 through ursolic acid, and increased reduction of tetrazolium salts. *Anticancer Res.* 16, 481–486.

Esser, V., Limbird, L.E., Brown, M.S., Goldstein, J.L. and Russell, D.W. (1988). Mutational analysis of the ligand binding domain of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* 263, 13282–13290.

Faust, D., Vondráček, J., Krčmář, P., Smerdová, L., Procházková, J., Hrubá, E., Hulinková, P., Kaina, B., Dietrich, C. and Machala, M. (2013). AhR-mediated changes in global gene expression in rat liver progenitor cells. *Arch. Toxicol.* 87, 681–698.

Ferrannini, E., Haffner, S.M., Mitchell, B.D. and Stern, M.P. (1991). Hyperinsulinaemia: the key feature of a cardiovascular and metabolic syndrome. *Diabetologia* 34, 416–422.

Ferré-Huguet, N., Bosch, C., Lourencetti, C., Nadal, M., Schuhmacher, M., Grimalt, J.O. and Domingo, J.L. (2009). Human health risk assessment of environmental exposure to organochlorine compounds in the Catalan stretch of the Ebro River, Spain. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 83, 662–667.

Field, P.A. and Gibbons, G.F. (2000). Decreased hepatic expression of the low-density lipoprotein (LDL) receptor and LDL receptor-related protein in aging rats is associated with delayed clearance of chylomicrons from the circulation. *Metabolism.* 49, 492–498.

Finkelstein, E.A., Trogon, J.G., Cohen, J.W. and Dietz, W. (2009). Annual medical spending attributable to obesity: payer-and service-specific estimates. *Health Aff. Proj. Hope* 28, w822–831.

Foster, W.G., Neal, M.S., Han, M.-S. and Dominguez, M.M. (2008). Environmental contaminants and human infertility: hypothesis or cause for concern? *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 11, 162–176.

Foth, H., Kahl, R. and Kahl, G.F. (1988). Pharmacokinetics of low doses of benzo[a]pyrene in the rat. *Food Chem. Toxicol.* 26, 45–51.

Fredrickson, D.S. and Lees EES, R.S. (1965). A system for phenotyping hyperlipoproteinemia. *Circulation* 31, 321–327.

Fujisawa-Sehara, A., Yamane, M. and Fujii-Kuriyama, Y. (1988). A DNA-binding factor specific for xenobiotic responsive elements of P-450c gene exists as a cryptic form in cytoplasm: its possible translocation to nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 5859–5863.

Gagnon, A., Antunes, T.T., Ly, T., Pongsuwan, P., Gavin, C., Lochnan, H.A. and Sorisky, A. (2010). Thyroid-stimulating hormone stimulates lipolysis in adipocytes in culture and raises serum free fatty acid levels in vivo. *Metabolism.* 59, 547–553.

Garcia, C.K., Wilund, K., Arca, M., Zuliani, G., Fellin, R., Maioli, M., Calandra, S., Bertolini, S., Cossu, F., Grishin, N., Barnes, R., Cohen, J.C., Hobbs, H.H. (2001). Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science* 292, 1394–1398.

Gaylord, N.G. and Gibbs, J.H. (1962). *Physical chemistry of macromolecules*. C. Tanford. Wiley, New York, 1961.

Gelboin, H.V. (1980). Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol. Rev.* 60, 1107–1166.

Gerde, P., Muggenburg, B.A., Hoover, M.D. and Henderson, R.F. (1993). Disposition of polycyclic aromatic hydrocarbons in the respiratory tract of the beagle dog. I. The alveolar region. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 121, 313–318.

Getz, G.S. and Reardon, C.A. (2009). Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *J. Lipid Res.* *50 Suppl*, S156–161.

Gherardi, E., Bowyer, D.E., Fitzsimmons, C., Le Cras, T., Hutchings, A. and Butcher, G. (1991). Probing of the expression of the low-density lipoprotein receptor in vivo using an anti-receptor monoclonal antibody. *Biochem. J.* *280*, 1–7.

Gibbons, G.F. (1990). Assembly and secretion of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem. J.* *268*, 1–13.

Ginsberg, H.N., Zhang, Y.-L. and Hernandez-Ono, A. (2006). Metabolic syndrome: focus on dyslipidemia. *Obes. Silver Spring Md* *14 Suppl 1*, 41S–49S.

Glatt, H.R. and Oesch, F. (1976). Phenolic benzo(a)pyrene metabolites are mutagens. *Mutat. Res.* *36*, 379–384.

Glaumann, H., Bergstrand, A. and Ericsson, J.L. (1975). Studies on the synthesis and intracellular transport of lipoprotein particles in rat liver. *J. Cell Biol.* *64*, 356–377.

Gofman, J.W., Lindgren, F.T. and Elliott, H. (1949). Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum. *J. Biol. Chem.* *179*, 973–979.

Goodman, H.M. and Kostyo, J.L. (1981). Altered profiles of biological activity of growth hormone fragments on adipocyte metabolism. *Endocrinology* *108*, 553–558.

Gough, P.J., Greaves, D.R. and Gordon, S. (1998). A naturally occurring isoform of the human macrophage scavenger receptor (SR-A) gene generated by alternative splicing blocks modified LDL uptake. *J. Lipid Res.* *39*, 531–543.

Greenwalt, D.E., Lipsky, R.H., Ockenhouse, C.F., Ikeda, H., Tandon, N.N. and Jamieson, G.A. (1992). Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood* *80*, 1105–1115.

Grova, N., Salquèbre, G., Schroeder, H. and Appenzeller, B.M.R. (2011). Determination of PAHs and OH-PAHs in rat brain by gas chromatography tandem (triple quadrupole) mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* *24*, 1653–1667.

- Grün, F. (2010). Obesogens. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 17, 453–459.
- Grün, F. and Blumberg, B. (2006). Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. *Endocrinology* 147, S50–55.
- Grün, F. and Blumberg, B. (2009). Minireview: the case for obesogens. *Mol. Endocrinol.* 23, 1127–1134.
- Grün, F., Watanabe, H., Zamanian, Z., Maeda, L., Arima, K., Cubacha, R., Gardiner, D.M., Kanno, J., Iguchi, T. and Blumberg, B. (2006). Endocrine-disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. *Mol. Endocrinol.* 20, 2141–2155.
- Grundy, S.M. (2007). Metabolic syndrome: a multiplex cardiovascular risk factor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 399–404.
- Grundy, S.M., Cleeman, J.I., Daniels, S.R., Donato, K.A., Eckel, R.H., Franklin, B.A., Gordon, D.J., Krauss, R.M., Savage, P.J., Smith, S.C. Jr., Spertus, J.A., Costa. F., (2006). Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Curr. Opin. Cardiol.* 21, 1–6.
- Hakura, A., Tsutsui, Y., Sonoda, J., Kai, J., Imade, T., Shimada, M., Sugihara, Y. and Mikami, T. (1998). Comparison between in vivo mutagenicity and carcinogenicity in multiple organs by benzo[a]pyrene in the lacZ transgenic mouse (Muta Mouse). *Mutat. Res.* 398, 123–130.
- Hanse, M. (2011). Rôle du récepteur aux lipoprotéines, LSR dans la régulation de transport et de la distribution des lipides alimentaire. Thèse de l'Université de Lorraine.
- Hao, C., Cheng, X., Xia, H. and Ma, X. (2012). The endocrine disruptor mono-(2-ethylhexyl) phthalate promotes adipocyte differentiation and induces obesity in mice. *Biosci. Rep.* 32, 619–629.
- Hatch, E.E., Nelson, J.W., Stahlhut, R.W. and Webster, T.F. (2010). Association of endocrine disruptors and obesity: perspectives from epidemiological studies. *Int. J. Androl.* 33, 324–332.
- Havel, R. and Kane, J. (1995). Structure and metabolism of plasma lipoproteins. *In* The metabolic and molecular basis of inherited disease (Scriver CR; Beaudet AL; Sly WS; Valle D;), pp. 1841–1851.

- Havel, R.J., Fielding, C.J., Olivecrona, T., Shore, V.G., Fielding, P.E. and Egelrud, T. (1973). Cofactor activity of protein components of human very low density lipoproteins in the hydrolysis of triglycerides by lipoproteins lipase from different sources. *Biochemistry* *12*, 1828–1833.
- He, K., Zhao, L., Daviglius, M.L., Dyer, A.R., Van Horn, L., Garside, D., Zhu, L., Guo, D., Wu, Y., Zhou, B. and Stamler, J. (2008). Association of monosodium glutamate intake with overweight in Chinese adults: the INTERMAP Study. *Obes. Silver Spring Md* *16*, 1875–1880.
- Hecht, S.S. (1999). Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* *91*, 1194–1210.
- Heindel, J.J. (2003). Endocrine disruptors and the obesity epidemic. *Toxicol. Sci.* *76*, 247–249.
- Heindel, J.J. and Levin, E. (2005). Developmental origins and environmental influences-- Introduction. NIEHS symposium. *Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* *73*, 469.
- Heindel, J.J. and vom Saal, F.S. (2009). Role of nutrition and environmental endocrine disrupting chemicals during the perinatal period on the aetiology of obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.* *304*, 90–96.
- Herbsleb, M., Birkenkamp-Demtroder, K., Thykjaer, T., Wiuf, C., Hein, A.-M.K., Orntoft, T.F. and Dyrskjöt, L. (2008). Increased cell motility and invasion upon knockdown of lipolysis stimulated lipoprotein receptor (LSR) in SW780 bladder cancer cells. *BMC Med. Genomics* *1*, 31.
- Hertz-Picciotto, I., Charles, M.J., James, R.A., Keller, J.A., Willman, E. and Teplin, S. (2005). *In utero* polychlorinated biphenyl exposures in relation to fetal and early childhood growth. *Epidemiol. Camb. Mass* *16*, 648–656.
- Herz, J. and Strickland, D.K. (2001). LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J. Clin. Invest.* *108*, 779–784.
- Hoch, M. (2001). Organotin compounds in the environment — an overview. *Appl. Geochem.* 719–743.

Hofmann, A.F., and Borgstorn, B. (1963). Hydrolysis of long-chain monoglycerides in micellar solution by pancreatic lipase. *Biochim. Biophys. Acta* 70, 317–331.

Hollenberg, C.H., Raben, M.S. and Astwood, E.B. (1961). The lipolytic response to corticotropin. *Endocrinology* 68, 589–598.

Holtcamp, W. (2012). Obesogens: an environmental link to obesity. *Environ. Health Perspect.* 120, a62–68.

Hovingh, G.K., Van Wijland, M.J.A., Brownlie, A., Bisoendial, R.J., Hayden, M.R., Kastelein, J.J.P., and Groen, A.K. (2003). The role of the ABCA1 transporter and cholesterol efflux in familial hypoalphalipoproteinemia. *J. Lipid Res.* 44, 1251–1255.

HSDB (1999). Phenanthrène. Hazardous Substances Data Bank, National Library of Medicine. (<http://toxnet.nlm.nih.gov>)

Huang, M., Blair, I.A and Penning, T.M. (2013). Identification of stable benzo[a]pyrene-7,8-dione-DNA adducts in human lung cells. *Chem. Res. Toxicol.* 26, 685–692.

Huberman, E., Sachs, L., Yang, S.K. and Gelboin, V. (1976). Identification of mutagenic metabolites of benzo(a)pyrene in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 607–611.

Huettinger, M., Schneider, W.J., Ho, Y.K., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1984). Use of monoclonal anti-receptor antibodies to probe the expression of the low density lipoprotein receptor in tissues of normal and Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *J. Clin. Invest.* 74, 1017–1026.

Hugo, E.R., Brandebourg, T.D., Woo, J.G., Loftus, J., Alexander, J.W. and Ben-Jonathan, N. (2008). Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes. *Environ. Health Perspect.* 116, 1642–1647.

Hutcheon, D.E., Kantrowitz, J., Van Gelder, R.N. and Flynn, E. (1983). Factors affecting plasma benzo[a]pyrene levels in environmental studies. *Environ. Res.* 32, 104–110.

Irigaray, P., Ogier, V., Jacquenet, S., Notet, V., Sibille, P., Méjean, L., Bihain, B.E. and Yen, F.T. (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, 1362–1372.

Ishii, J., Adachi, H., Aoki, J., Koizumi, H., Tomita, S., Suzuki, T., Tsujimoto, M., Inoue, K. and Arai, H. (2002). SREC-II, a new member of the scavenger receptor type F family, trans-interacts with SREC-I through its extracellular domain. *J. Biol. Chem.* 277, 39696–39702.

Jiang, J., Yu, B., Yu, Z. and Wu, Y. (1997). Effects of superoxide anion, B(alpha)P and TPA on the membrane fluidity of NIH3T3 cells. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 19, 217–221.

Jiang, Z., Shih, D.M., Xia, Y.R., Lusic, A.J., de Beer, F.C., de Villiers, W.J., van der Westhuyzen, D.R. and de Beer, M.C. (1998). Structure, organization, and chromosomal mapping of the gene encoding macrosialin, a macrophage-restricted protein. *Genomics* 50, 199–205.

Ben-Jonathan, N., Hugo, E.R. and Brandebourg, T.D. (2009). Effects of bisphenol A on adipokine release from human adipose tissue: Implications for the metabolic syndrome. *Mol. Cell. Endocrinol.* 304, 49–54.

Jong, M.C., Hofker, M.H. and Havekes, L.M. (1999). Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 472–484.

Juan, C.-C., Chang, C.-L., Lai, Y.-H. and Ho, L.-T. (2005). Endothelin-1 induces lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288, E1146–1152.

Kao, J., Patterson, F.K. and Hall, J. (1985). Skin penetration and metabolism of topically applied chemicals in six mammalian species, including man: an *in vitro* study with benzo[a]pyrene and testosterone. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 81, 502–516.

Karpe, F. (1999). Postprandial lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *J. Intern. Med.* 246, 341–355.

Kataoka, H., Kume, N., Miyamoto, S., Minami, M., Murase, T., Sawamura, T., Masaki, T., Hashimoto, N. and Kita, T. (2000). Biosynthesis and post-translational processing of lectin-like

oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1). N-linked glycosylation affects cell-surface expression and ligand binding. *J. Biol. Chem.* 275, 6573–6579.

Kaysen, G.A. (2007). Hyperlipidemia in chronic kidney disease. *Int. J. Artif. Organs* 30, 987–992.

Kazerouni, N., Sinha, R., Hsu, C.H., Greenberg, A. and Rothman, N. (2001). Analysis of 200 food items for benzo[*a*]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. *Food Chem. Toxicol.* 39, 423–436.

Keen, H., Thomas, B.J., Jarrett, R.J. and Fuller, J.H. (1979). Nutrient intake, adiposity, and diabetes. *Br. Med. J.* 1, 655–658.

Kelman, B.J. and Springer, D.L. (1982). Movements of benzo[*a*]pyrene across the hemochorial placenta of the guinea pig. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 169, 58–62.

Kimbrough, R.D., Krouskas, C.A., Carson, M.L., Long, T.F., Bevan, C. and Tardiff, R.G. (2010). Human uptake of persistent chemicals from contaminated soil: PCDD/Fs and PCBs. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* RTP 57, 43–54.

Knittle, J.L., Timmers, K., Ginsberg-Fellner, F., Brown, R.E. and Katz, D.P. (1979). The growth of adipose tissue in children and adolescents. Cross-sectional and longitudinal studies of adipose cell number and size. *J. Clin. Invest.* 63, 239–246.

Koga, S., Horwitz, D.L. and Scanu, A.M. (1969). Isolation and properties of lipoproteins from normal rat serum. *J. Lipid Res.* 10, 577–588.

Kraal, G., van der Laan, L.J., Elomaa, O. and Tryggvason, K. (2000). The macrophage receptor MARCO. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 2, 313–316.

Krotkiewski, M., Björntorp, P., Sjöström, L. and Smith, U. (1983). Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J. Clin. Invest.* 72, 1150–1162.

Kuczmarski, R.J., Carroll, M.D., Flegal, K.M. and Troiano, R.P. (1997). Varying body mass index cutoff points to describe overweight prevalence among U.S. adults: NHANES III (1988 to 1994). *Obes. Res.* 5, 542–548.

- Kwack, S.J. and Lee, B.M. (2000). Correlation between DNA or protein adducts and benzo[a]pyrene diol epoxide I-triglyceride adduct detected *in vitro* and *in vivo*. *Carcinogenesis* 21, 629–632.
- Large, V., Peroni, O., Letexier, D., Ray, H. and Beylot, M. (2004). Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab.* 30, 294–309.
- LaRosa, J.C., Levy, R.I., Herbert, P., Lux, S.E. and Fredrickson, D.S. (1970). A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 57–62.
- Letexier, D., Pinteur, C., Large, V., Fréring, V. and Beylot, M. (2003). Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue. *J. Lipid Res.* 44, 2127–2134.
- Levin, W., Wood, A.W., Chang, R.L., Slaga, T.J., Yagi, H., Jerina, D.M. and Conney, A.H. (1977). Marked differences in the tumor-initiating activity of optically pure (+)- and (-)-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene on mouse skin. *Cancer Res.* 37, 2721–2725.
- Li, S., Pan, D. and Wang, G. (1994). Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in cooking oil fumes. *Arch. Environ. Health* 49, 119–122.
- Li, T., Matozel, M., Boehme, S., Kong, B., Nilsson, L.-M., Guo, G., Ellis, E. and Chiang, J.Y.L. (2011). Overexpression of cholesterol 7 α -hydroxylase promotes hepatic bile acid synthesis and secretion and maintains cholesterol homeostasis. *Hepatol.* 53, 996–1006.
- Lim, J.S., Mietus-Snyder, M., Valente, A., Schwarz, J.-M. and Lustig, R.H. (2010). The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 251–264.
- Linares, V., Perelló, G., Nadal, M., Gómez-Catalán, J., Llobet, J.M. and Domingo, J.L. (2010). Environmental versus dietary exposure to POPs and metals: a probabilistic assessment of human health risks. *J. Environ. Monit.* 12, 681–688.
- Longnecker, M.P. and Daniels, J.L. (2001). Environmental contaminants as etiologic factors for diabetes. *Environ. Health Perspect.* 109 Suppl 6, 871–876.

- López, E., Schuhmacher, M. and Domingo, J.L. (2008). Human health risks of petroleum-contaminated groundwater. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* *15*, 278–288.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* *193*, 265–275.
- Luiken, J.J., Arumugam, Y., Dyck, D.J., Bell, R.C., Pelsers, M.M., Turcotte, L.P., Tandon, N.N., Glatz, J.F. and Bonen, A. (2001). Increased rates of fatty acid uptake and plasmalemmal fatty acid transporters in obese Zucker rats. *J. Biol. Chem.* *276*, 40567–40573.
- Lusa, S., and Somerharju, P. (1998). Degradation of low density lipoprotein cholesterol esters by lysosomal lipase *in vitro*. Effect of core physical state and basis of species selectivity. *Biochim. Biophys. Acta* *1389*, 112–122.
- Lusis, A.J. and Pajukanta, P. (2008). A treasure trove for lipoprotein biology. *Nat. Genet.* *40*, 129–130.
- MacDonald, P.N. and Ong, D.E. (1988). Evidence for a lecithin-retinol acyltransferase activity in the rat small intestine. *J. Biol. Chem.* *263*, 12478–12482.
- Maioli, E., Torricelli, C., Fortino, V., Carlucci, F., Tommassini, V. and Pacini, A. (2009). Critical Appraisal of the MTT Assay in the Presence of Rottlerin and Uncouplers. *Biol. Proced. Online* *11*, 227–240.
- Mann, C.J., Khallou, J., Chevreuril, O., Troussard, A.A., Guermani, L.M., Launay, K., Delplanque, B., Yen, F.T. and Bihain, B.E. (1995). Mechanism of activation and functional significance of the lipolysis-stimulated receptor. Evidence for a role as chylomicron remnant receptor. *Biochemistry* *34*, 10421–10431.
- Mansbach, C.M., 2nd and Gorelick, F. (2007). Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. II. Dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and the intracellular packaging and secretion of chylomicrons. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *293*, G645–650.
- Marcus, C., Ehrén, H., Bolme, P. and Arner, P. (1988). Regulation of lipolysis during the neonatal period. Importance of thyrotropin. *J. Clin. Invest.* *82*, 1793–1797.

Martí-Cid, R., Llobet, J.M., Castell, V. and Domingo, J.L. (2008a). Evolution of the dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in Catalonia, Spain. *Food Chem. Toxicol.* *46*, 3163–3171.

Martí-Cid, R., Llobet, J.M., Castell, V. and Domingo, J.L. (2008b). Human exposure to polychlorinated naphthalenes and polychlorinated diphenyl ethers from foods in Catalonia, Spain: temporal trend. *Environ. Sci. Technol.* *42*, 4195–4201.

Masih, J. (2012). Seasonal Variation and Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Indoor and Outdoor Air in a Semi Arid Tract of Northern India. *Aerosol Air Qual. Res.* *12*, 515–525

Masuda, S., Oda, Y., Sasaki, H., Ikenouchi, J., Higashi, T., Akashi, M., Nishi, E. and Furuse, M. (2011). LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells. *J. Cell Sci.* *124*, 548–555.

Masuno, H., Kidani, T., Sekiya, K., Sakayama, K., Shiosaka, T., Yamamoto, H. and Honda, K. (2002). Bisphenol A in combination with insulin can accelerate the conversion of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes. *J. Lipid Res.* *43*, 676–684.

Masuno, H., Iwanami, J., Kidani, T., Sakayama, K. and Honda, K. (2005). Bisphenol a accelerates terminal differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Toxicol. Sci.* *84*, 319–327.

Matsumoto, A., Naito, M., Itakura, H., Ikemoto, S., Asaoka, H., Hayakawa, I., Kanamori, H., Aburatani, H., Takaku, F. and Suzuki, H. (1990). Human macrophage scavenger receptors: primary structure, expression, and localization in atherosclerotic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 9133–9137.

Mattson, F.H. and Volpenhein, R.A. (1968). Hydrolysis of primary and secondary esters of glycerol by pancreatic juice. *J. Lipid Res.* *9*, 79–84.

Mattson, F.H. and Berck, L.W. (1956). The specificity of pancreatic lipase for the primary hydroxyl groups of glycerides. *J. Biol. Chem.* *219*, 735–740.

Maxfield, F.R. and Tabas, I. (2005). Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* *438*, 612–621.

May, P., Herz, J. and Bock, H.H. (2005). Molecular mechanisms of lipoprotein receptor signalling. *Cell. Mol. Life Sci.* *62*, 2325–2338.

McAllister, E.J., Dhurandhar, N.V., Keith, S.W., Aronne, L.J., Barger, J., Baskin, M., Benca, R.M., Biggio, J., Boggiano, M.M., Eisenmann, J.C., Elobeid, M., Fontaine, K.R., Gluckman, P., Hanlon, E.C., Katzmarzyk, P., Pietrobelli, A., Redden, D.T., Ruden, D.M., Wang, C., Waterland, R.A., Wright, S.M. and Allison, D.B. (2009). Ten putative contributors to the obesity epidemic. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* *49*, 868–913.

Mead, J.R., Irvine, S.A. and Ramji, D.P. (2002). Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J. Mol. Med. (Berl.)* *80*, 753–769.

Van Meerloo, J., Kaspers, G.J.L. and Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol. Biol.* *731*, 237–245.

Mendivil, C.O., Zheng, C., Furtado, J., Lel, J. and Sacks, F.M. (2010). Metabolism of very-low-density lipoprotein and low-density lipoprotein containing apolipoprotein C-III and not other small apolipoproteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *30*, 239–245.

Merkel, M., Eckel, R.H. and Goldberg, I.J. (2002). Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J. Lipid Res.* *43*, 1997–2006.

Mesli, S., Javorschi, S., Bérard, A.M., Landry, M., Priddle, H., Kivlichan, D., Smith, A.J.H., Yen, F.T., Bihain, B.E. and Darmon, M. (2004). Distribution of the lipolysis stimulated receptor in adult and embryonic murine tissues and lethality of LSR^{-/-} embryos at 12.5 to 14.5 days of gestation. *Eur. J. Biochem.* *271*, 3103–3114.

Miller, K.W. and Small, D.M. (1983). Surface-to-core and interparticle equilibrium distributions of triglyceride-rich lipoprotein lipids. *J. Biol. Chem.* *258*, 13772–13784.

Minet-Ringuet, J., Even, P.C., Valet, P., Carpené, C., Visentin, V., Prévot, D., Daviaud, D., Quignard-Boulangé, A., Tomé, D. and de Beaurepaire, R. (2007). Alterations of lipid metabolism and gene expression in rat adipocytes during chronic olanzapine treatment. *Mol. Psychiatry* *12*, 562–571.

Mitchell, C.E., Fischer, J.P. and Dahl, A.R. (1987). Differential induction of cytochrome P-450 catalyzed activities by polychlorinated biphenyls and benzo [a]pyrene in B6C3F1 mouse liver and lung. *Toxicology* 43, 315–323.

Miura, H., Tomoda, H., Miura, K., Takishima, K. and Omura, S. (1996). Lactacystin increases LDL receptor level on HepG2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227, 684–687.

Modica, R., Fiume, M., Guaitani, A. and Bartosek, I. (1983). Comparative kinetics of benz(a)anthracene, chrysene and triphenylene in rats after oral administration. I. Study with single compounds. *Toxicol. Lett.* 18, 103–109.

Moestrup, S.K., Gliemann, J. and Pallesen, G. (1992). Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues. *Cell Tissue Res.* 269, 375–382.

Mokdad, A.H., Serdula, M.K., Dietz, W.H., Bowman, B.A., Marks, J.S. and Koplan, J.P. (1999). The spread of the obesity epidemic in the United States, 1991-1998. *J. Am. Med. Assoc.* 282, 1519–1522.

Mokdad, A.H., Ford, E.S., Bowman, B.A., Dietz, W.H., Vinicor, F., Bales, V.S. and Marks, J.S. (2003). Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *J. Am. Med. Assoc.* 289, 76–79.

Molina-Molina, J.-M., Amaya, E., Grimaldi, M., Sáenz, J.-M., Real, M., Fernández, M.F., Balaguer, P. and Olea, N. (2013). *In vitro* study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 127–136.

Moskowitz, J. and Fain, J.N. (1969). Hormonal regulation of lipolysis and phosphorylase activity in human fat cells. *J. Clin. Invest.* 48, 1802–1808.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.

Mu, H. and Høy, C.-E. (2004). The digestion of dietary triacylglycerols. *Prog. Lipid Res.* 43, 105–133.

- Nadal, M., Schuhmacher, M. and Domingo, J.L. (2011). Long-term environmental monitoring of persistent organic pollutants and metals in a chemical/petrochemical area: human health risks. *Environ. Pollut. Barking Essex 1987* *159*, 1769–1777.
- Narvekar, P., Berriel Diaz, M., Krones-Herzig, A., Hardeland, U., Strzoda, D., Stöhr, S., Frohme, M. and Herzig, S. (2009). Liver-specific loss of lipolysis-stimulated lipoprotein receptor triggers systemic hyperlipidemia in mice. *Diabetes* *58*, 1040–1049.
- Neubert, D. and Tapken, S. (1988). Transfer of benzo(a)pyrene into mouse embryos and fetuses. *Arch. Toxicol.* *62*, 236–239.
- Newbold, R.R., Padilla-Banks, E., Snyder, R.J. and Jefferson, W.N. (2005). Developmental exposure to estrogenic compounds and obesity. *Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* *73*, 478–480.
- Newbold, R.R., Padilla-Banks, E., Snyder, R.J. and Jefferson, W.N. (2007a). Perinatal exposure to environmental estrogens and the development of obesity. *Mol. Nutr. Food Res.* *51*, 912–917.
- Newbold, R.R., Padilla-Banks, E., Snyder, R.J., Phillips, T.M. and Jefferson, W.N. (2007b). Developmental exposure to endocrine disruptors and the obesity epidemic. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* *23*, 290–296.
- Newbold, R.R., Padilla-Banks, E., Jefferson, W.N. and Heindel, J.J. (2008). Effects of endocrine disruptors on obesity. *Int. J. Androl.* *31*, 201–208.
- Nicholson, J.W. (1989). The early history of organotin chemistry. *J. Chem. Educ.* *66*, 621.
- Nimpf, J., and Schneider, W.J. (1998). The VLDL receptor: an LDL receptor relative with eight ligand binding repeats, LR8. *Atherosclerosis* *141*, 191–202.
- Noorlander, C.W., van Leeuwen, S.P.J., Te Biesebeek, J.D., Mengelers, M.J.B. and Zeilmaker, M.J. (2011). Levels of perfluorinated compounds in food and dietary intake of PFOS and PFOA in the Netherlands. *J. Agric. Food Chem.* *59*, 7496–7505.
- Nose, T., Tokunaga, T. and Shimohigashi, Y. (2009). Exploration of endocrine-disrupting chemicals on estrogen receptor alpha by the agonist/antagonist differential-docking screening

(AADS) method: 4-(1-adamantyl)phenol as a potent endocrine disruptor candidate. *Toxicol. Lett.* 191, 33–39.

ObEpi (2009). Enquête épidémiologique nationale sur le surpoids et l'obésité. *ROCHE* 1–51.

ObEpi (2012). Enquête épidémiologique nationale sur le surpoids et l'obésité. *ROCHE* 1–60.

Ogden, C.L., Carroll, M., Kit, M.D, B., and Flegal, K. (2012). Prevalence of Obesity in the United States, 2009–2010. *NCHS Data Brief* 82, 1–8.

Ogura, M., Ayaori, M., Terao, Y., Hisada, T., Iizuka, M., Takiguchi, S., Uto-Kondo, H., Yakushiji, E., Nakaya, K., Sasaki, M., Komatsu, T., Ozasa, H., Ohsuzu, F., and Ikewaki, K. (2011). Proteasomal inhibition promotes ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) and ABCG1 expression and cholesterol efflux from macrophages *in vitro* and *in vivo*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 1980–1987.

Oka, K., Ishimura-Oka, K., Chu, M.J., Sullivan, M., Krushkal, J., Li, W.H. and Chan, L. (1994). Mouse very-low-density-lipoprotein receptor (VLDLR) cDNA cloning, tissue-specific expression and evolutionary relationship with the low-density-lipoprotein receptor. *Eur. J. Biochem.* 224, 975–982.

Olea, N., Pulgar, R., Pérez, P., Olea-Serrano, F., Rivas, A., Novillo-Fertrell, A., Pedraza, V., Soto, A.M. and Sonnenschein, C. (1996). Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ. Health Perspect.* 104, 298–305.

Padmanabhan, V., Siefert, K., Ransom, S., Johnson, T., Pinkerton, J., Anderson, L., Tao, L. and Kannan, K. (2008). Maternal bisphenol-A levels at delivery: a looming problem? *J. Perinatol.* 28, 258–263.

Pagliacci, M.C., Spinuzzi, F., Migliorati, G., Fumi, G., Smacchia, M., Grignani, F., Riccardi, C. and Nicoletti, I. (1993). Genistein inhibits tumour cell growth *in vitro* but enhances mitochondrial reduction of tetrazolium salts: a further pitfall in the use of the MTT assay for evaluating cell growth and survival. *Eur. J. Cancer* 29A, 1573–1577.

Palanikumar, L., Kumaraguru, A.K., Ramakritinan, C.M. and Anand, M. (2012). Biochemical response of anthracene and benzo [a] pyrene in milkfish *Chanos chanos*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 75, 187–197.

Papatheodorou, P., Carette, J.E., Bell, G.W., Schwan, C., Guttenberg, G., Brummelkamp, T.R. and Aktories, K. (2011). Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) is the host receptor for the binary toxin *Clostridium difficile* transferase (CDT). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 16422–16427.

Papatheodorou, P., Wilczek, C., Nölke, T., Guttenberg, G., Hornuss, D., Schwan, C. and Aktories, K. (2012). Identification of the cellular receptor of *Clostridium spiroforme* toxin. *Infect. Immun.* *80*, 1418–1423.

Patisaul, H.B. and Adewale, H.B. (2009). Long-term effects of environmental endocrine disruptors on reproductive physiology and behavior. *Front. Behav. Neurosci.* *3*, 10-22.

Pearson, A., Lux, A. and Krieger, M. (1995). Expression cloning of dSR-CI, a class C macrophage-specific scavenger receptor from *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 4056–4060.

Peiffer, J., Cosnier, F., Grova, N., Nunge, H., Salquèbre, G., Decret, M.-J., Cossec, B., Rychen, G., Appenzeller, B.M.R. and Schroeder, H. (2013). Neurobehavioral toxicity of a repeated exposure (14 days) to the airborne polycyclic aromatic hydrocarbon fluorene in adult Wistar male rats. *PloS One*, DOI: 10.1371/journal.pone.0071413

Pejic, R.N. and Lee, D.T. (2006). Hypertriglyceridemia. *J. Am. Board Fam. Med.* *19*, 310–316.

Pelkonen, O., and Nebert, D.W. (1982). Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: etiologic role in carcinogenesis. *Pharmacol. Rev.* *34*, 189–222.

Pelletier, C., Doucet, E., Imbeault, P. and Tremblay, A. (2002). Associations between weight loss-induced changes in plasma organochlorine concentrations, serum T(3) concentration, and resting metabolic rate. *Toxicol. Sci.* *67*, 46–51.

Peng, Y., Akmentin, W., Connelly, M.A., Lund-Katz, S., Phillips, M.C. and Williams, D.L. (2004). Scavenger receptor BI (SR-BI) clustered on microvillar extensions suggests that this plasma membrane domain is a way station for cholesterol trafficking between cells and high-density lipoprotein. *Mol. Biol. Cell* *15*, 384–396.

- Perelló, G., Gómez-Catalán, J., Castell, V., Llobet, J.M. and Domingo, J.L. (2012). Estimation of the daily intake of hexachlorobenzene from food consumption by the population of Catalonia, Spain: Health risks. *Food Control* 23, 198–202.
- Perez-Pozo, S.E., Schold, J., Nakagawa, T., Sánchez-Lozada, L.G., Johnson, R.J. and Lillo, J.L. (2010). Excessive fructose intake induces the features of metabolic syndrome in healthy adult men: role of uric acid in the hypertensive response. *Int. J. Obes.* 34, 454–461.
- Phan, C.T. and Tso, P. (2001). Intestinal lipid absorption and transport. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 6, D299–319.
- Piver, W.T. (1973). Organotin compounds: industrial applications and biological investigation. *Environ. Health Perspect.* 4, 61–79.
- Plant, A.L., Benson, D.M. and Smith, L.C. (1985). Cellular uptake and intracellular localization of benzo(a)pyrene by digital fluorescence imaging microscopy. *J. Cell Biol.* 100, 1295–1308.
- Polyakov, L.M., Chasovskikh, M.I. and Panin, L.E. (1996). Binding and transport of benzo[a]pyrene by blood plasma lipoproteins: the possible role of apolipoprotein B in this process. *Bioconjug. Chem.* 7, 396–400.
- Porter, F.D. (2002). Malformation syndromes due to inborn errors of cholesterol synthesis. *J. Clin. Invest.* 110, 715–724.
- Prentice, A.M. (2001). Overeating: the health risks. *Obes. Res.* 9 Suppl 4, 234S–238S.
- Prevo, R., Banerji, S., Ni, J. and Jackson, D.G. (2004). Rapid plasma membrane-endosomal trafficking of the lymph node sinus and high endothelial venule scavenger receptor/homing receptor stabilin-1 (FEEL-1/CLEVER-1). *J. Biol. Chem.* 279, 52580–52592.
- Ptak, A. and Lucja, E. (2013). Oestrogens, Xenoestrogens and Hormone-Dependent Cancers. In *Carcinogenesis*, K. Tonissen, ed. (InTech),.
- Qiu, Z., Strickland, D.K., Hyman, B.T. and Rebeck, G.W. (2002). alpha 2-Macroglobulin exposure reduces calcium responses to N-methyl-D-aspartate via low density lipoprotein receptor-related protein in cultured hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 277, 14458–14466.

- Ramesh, A., Inyang, F., Hood, D.B., Archibong, A.E., Knuckles, M.E. and Nyanda, A.M. (2001). Metabolism, bioavailability, and toxicokinetics of benzo(alpha)pyrene in F-344 rats following oral administration. *Exp. Toxicol. Pathol. Off. J. Ges. Für Toxikol. Pathol.* *53*, 275–290.
- Rämet, M., Pearson, A., Manfrulli, P., Li, X., Koziel, H., Göbel, V., Chung, E., Krieger, M. and Ezekowitz, R.A. (2001). Drosophila scavenger receptor CI is a pattern recognition receptor for bacteria. *Immunity* *15*, 1027–1038.
- Ramprasad, M.P., Terpstra, V., Kondratenko, N., Quehenberger, O. and Steinberg, D. (1996). Cell surface expression of mouse macrosialin and human CD68 and their role as macrophage receptors for oxidized low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 14833–14838.
- Reaven, G.M. (1988). Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* *37*, 1595–1607.
- Reboul, E., Klein, A., Bietrix, F., Gleize, B., Malezet-Desmoulins, C., Schneider, M., Margotat, A., Lagrost, L., Collet, X. and Borel, P. (2006). Scavenger receptor class B type I (SR-BI) is involved in vitamin E transport across the enterocyte. *J. Biol. Chem.* *281*, 4739–4745.
- Redgrave, T.G. (1970). Formation of cholesteryl ester-rich particulate lipid during metabolism of chylomicrons. *J. Clin. Invest.* *49*, 465–471.
- Redgrave, T.G. and Small, D.M. (1979). Quantitation of the transfer of surface phospholipid of chylomicrons to the high density lipoprotein fraction during the catabolism of chylomicrons in the rat. *J. Clin. Invest.* *64*, 162–171.
- Rees, E.D., Mandelstam, P., Lowry, J.Q. and Lipscomb, H. (1971). A study of the mechanism of intestinal absorption of benzo(a)pyrene. *Biochim. Biophys. Acta* *225*, 96–107.
- Rhainds, D. and Brissette, L. (1999). Low density lipoprotein uptake: holoparticle and cholesteryl ester selective uptake. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *31*, 915–931.
- Rodenburg, K.W., and van der Horst, D.J. (2005). Lipoprotein-mediated lipid transport in insects: analogy to the mammalian lipid carrier system and novel concepts for the functioning of LDL receptor family members. *Biochim. Biophys. Acta* *1736*, 10–29.

- Rohlmann, A., Gotthardt, M., Hammer, R.E. and Herz, J. (1998). Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. *J. Clin. Invest.* *101*, 689–695.
- Rosen, E.D., Walkey, C.J., Puigserver, P. and Spiegelman, B.M. (2000). Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* *14*, 1293–1307.
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* *340*, 115–126.
- Rossmeisl, M., Flachs, P., Brauner, P., Sponarova, J., Matejkova, O., Prazak, T., Ruzickova, J., Bardova, K., Kuda, O. and Kopecky, J. (2004). Role of energy charge and AMP-activated protein kinase in adipocytes in the control of body fat stores. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* *28 Suppl 4*, S38–44.
- Rostami, I. and Juhasz, A.L. (2011). Assessment of Persistent Organic Pollutant (POP) Bioavailability and Bioaccessibility for Human Health Exposure Assessment: A Critical Review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* *41*, 623–656.
- Rubin, B.S., Murray, M.K., Damassa, D.A., King, J.C. and Soto, A.M. (2001). Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ. Health Perspect.* *109*, 675–680.
- Rubinstein, A., Gibson, J.C., Paterniti, J.R., Jr, Kakis, G., Little, A., Ginsberg, H.N. and Brown, W.V. (1985). Effect of heparin-induced lipolysis on the distribution of apolipoprotein e among lipoprotein subclasses. Studies with patients deficient in hepatic triglyceride lipase and lipoprotein lipase. *J. Clin. Invest.* *75*, 710–721.
- Rubinsztein, D.C., Cohen, J.C., Berger, G.M., van der Westhuyzen, D.R., Coetzee, G.A. and Gevers, W. (1990). Chylomicron remnant clearance from the plasma is normal in familial hypercholesterolemic homozygotes with defined receptor defects. *J. Clin. Invest.* *86*, 1306–1312.
- Ryan, K.K., Haller, A.M., Sorrell, J.E., Woods, S.C., Jandacek, R.J. and Seeley, R.J. (2010). Perinatal exposure to bisphenol-a and the development of metabolic syndrome in CD-1 mice. *Endocrinology* *151*, 2603–2612.

- Sakurai, K., Kawazuma, M., Adachi, T., Harigaya, T., Saito, Y., Hashimoto, N. and Mori, C. (2004). Bisphenol A affects glucose transport in mouse 3T3-F442A adipocytes. *Br. J. Pharmacol.* *141*, 209–214.
- Sanders, C.L., Skinner, C. and Gelman, R.A. (1986). Percutaneous absorption of 7, 10 ¹⁴C-benzo[a]pyrene and 7, 12 ¹⁴C-dimethylbenz[a]anthracene in mice. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* *7*, 25–34.
- Sankala, M., Brännström, A., Schulthess, T., Bergmann, U., Morgunova, E., Engel, J., Tryggvason, K. and Pikkarainen, T. (2002). Characterization of recombinant soluble macrophage scavenger receptor MARCO. *J. Biol. Chem.* *277*, 33378–33385.
- Sargis, R.M., Johnson, D.N., Choudhury, R.A. and Brady, M.J. (2010). Environmental endocrine disruptors promote adipogenesis in the 3T3-L1 cell line through glucocorticoid receptor activation. *Obes. Silver Spring Md* *18*, 1283–1288.
- Scanu, A. (1966). Forms of human serum high density lipoprotein protein. *J. Lipid Res.* *7*, 295–306.
- Scanu, A., and Page I.H. (1959). Separation and characterization of human serum chylomicrons. *J. Exp. Med.* *109*, 239–256.
- Schaffer, J.E. and Lodish, H.F. (1994). Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* *79*, 427–436.
- Schechter, A., Colacino, J., Haffner, D., Patel, K., Opel, M., Pöpke, O. and Birnbaum, L. (2010). Perfluorinated compounds, polychlorinated biphenyls, and organochlorine pesticide contamination in composite food samples from Dallas, Texas, USA. *Environ. Health Perspect.* *118*, 796–802.
- Schmidt, J.V. and Bradfield, C.A. (1996). Ah receptor signaling pathways. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *12*, 55–89.
- Schönfelder, G., Wittfoht, W., Hopp, H., Talsness, C.E., Paul, M. and Chahoud, I. (2002). Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ. Health Perspect.* *110*, A703–707.

- Schug, T.T., Janesick, A., Blumberg, B. and Heindel, J.J. (2011). Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *127*, 204–215.
- Schwartz, G.G., Il'yasova, D. and Ivanova, A. (2003). Urinary cadmium, impaired fasting glucose, and diabetes in the NHANES III. *Diabetes Care* *26*, 468–470.
- Segrest, J.P., Jackson, R.L., Morrisett, J.D. and Gotto, A.M., Jr (1974). A molecular theory of lipid-protein interactions in the plasma lipoproteins. *FEBS Lett.* *38*, 247–258.
- Segrest, J.P., Jones, M.K., De Loof, H., Brouillette, C.G., Venkatachalapathi, Y.V. and Anantharamaiah, G.M. (1992). The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J. Lipid Res.* *33*, 141–166.
- Sengenès, C., Berlan, M., De Glisezinski, I., Lafontan, M. and Galitzky, J. (2000). Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *FASEB J.* *14*, 1345–1351.
- Shelburne, F., Hanks, J., Meyers, W. and Quarfordt, S. (1980). Effect of apoproteins on hepatic uptake of triglyceride emulsions in the rat. *J. Clin. Invest.* *65*, 652–658.
- Shen, M.M., Krauss, R.M., Lindgren, F.T. and Forte, T.M. (1981). Heterogeneity of serum low density lipoproteins in normal human subjects. *J. Lipid Res.* *22*, 236–244.
- Shepherd, J. (1994). Lipoprotein metabolism. An overview. *Drugs* *47 Suppl 2*, 1–10.
- Shepherd, J. and Packard, C.J. (1986). Receptor-independent low-density lipoprotein catabolism. *Methods Enzymol.* *129*, 566–590.
- Sherrill, B.C., Innerarity, T.L. and Mahley, R.W. (1980). Rapid hepatic clearance of the canine lipoproteins containing only the E apoprotein by a high affinity receptor. Identity with the chylomicron remnant transport process. *J. Biol. Chem.* *255*, 1804–1807.
- Shibata, M., Ishii, J., Koizumi, H., Shibata, N., Dohmae, N., Takio, K., Adachi, H., Tsujimoto, M. and Arai, H. (2004). Type F scavenger receptor SREC-I interacts with advillin, a member of the gelsolin/villin family, and induces neurite-like outgrowth. *J. Biol. Chem.* *279*, 40084–40090.

Shimaoka, T., Kume, N., Minami, M., Hayashida, K., Kataoka, H., Kita, T. and Yonehara, S. (2000). Molecular cloning of a novel scavenger receptor for oxidized low density lipoprotein, SR-PSOX, on macrophages. *J. Biol. Chem.* *275*, 40663–40666.

Shimaoka, T., Nakayama, T., Kume, N., Takahashi, S., Yamaguchi, J., Minami, M., Hayashida, K., Kita, T., Ohsumi, J., Yoshie, O. and Yonehara, S. (2003). Cutting edge: SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates bacterial phagocytosis by APCs through its chemokine domain. *J. Immunol.* *171*, 1647–1651.

Shimomura, I., Bashmakov, Y., Shimano, H., Horton, J.D., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1997). Cholesterol feeding reduces nuclear forms of sterol regulatory element binding proteins in hamster liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 12354–12359.

Shinomiya, N. and Shinomiya, M. (2003). Dichlorodiphenyltrichloroethane suppresses neurite outgrowth and induces apoptosis in PC12 pheochromocytoma cells. *Toxicol. Lett.* *137*, 175–183.

Siddiqi, S.A., Gorelick, F.S., Mahan, J.T. and Mansbach, C.M., 2nd (2003). COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum budding of the pre-chylomicron transport vesicle. *J. Cell Sci.* *116*, 415–427.

De Silva, H.V., Lauer, S.J., Wang, J., Simonet, W.S., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W. and Taylor, J.M. (1994). Overexpression of human apolipoprotein C-III in transgenic mice results in an accumulation of apolipoprotein B48 remnants that is corrected by excess apolipoprotein E. *J. Biol. Chem.* *269*, 2324–2335.

Sims, P. and Grover, P.L. (1974). Epoxides in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and carcinogenesis. *Adv. Cancer Res.* *20*, 165–274.

Skolness, S.Y., Blanksma, C.A., Cavallin, J.E., Churchill, J.J., Durhan, E.J., Jensen, K.M., Johnson, R.D., Kahl, M.D., Makynen, E.A., Villeneuve, D.L. and Ankley G.T. (2013). Propiconazole inhibits steroidogenesis and reproduction in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicol. Sci.* *132*, 284–297.

Slaga, T.J., Bracken, W.J., Gleason, G., Levin, W., Yagi, H., Jerina, D.M. and Conney, A.H. (1979). Marked differences in the skin tumor-initiating activities of the optical enantiomers of the diastereomeric benzo(a)pyrene 7,8-diol-9,10-epoxides. *Cancer Res.* 39, 67–71.

Smink, A., Ribas-Fito, N., Garcia, R., Torrent, M., Mendez, M.A., Grimalt, J.O. and Sunyer, J. (2008). Exposure to hexachlorobenzene during pregnancy increases the risk of overweight in children aged 6 years. *Acta Paediatr.* 97, 1465–1469.

Soeder, K.J., Snedden, S.K., Cao, W., Della Rocca, G.J., Daniel, K.W., Luttrell, L.M. and Collins, S. (1999). The beta3-adrenergic receptor activates mitogen-activated protein kinase in adipocytes through a Gi-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 274, 12017–12022.

Somm, E., Schwitzgebel, V.M., Toulotte, A., Cederroth, C.R., Combescure, C., Nef, S., Aubert, M.L. and Hüppi, P.S. (2009). Perinatal exposure to bisphenol a alters early adipogenesis in the rat. *Environ. Health Perspect.* 117, 1549–1555.

Soto, A.M. and Sonnenschein, C. (2010). Environmental causes of cancer: endocrine disruptors as carcinogens. *Nat. Rev. Endocrinol.* 6, 363–370.

Spalding, K.L., Arner, E., Westermark, P.O., Bernard, S., Buchholz, B.A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Näslund, E., Britton, T., Concha, H., Hassan, M., Rydén, M., Frisén, J. and Arner, P. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453, 783–787.

Stamler, J., Daviglius, M.L., Garside, D.B., Dyer, A.R., Greenland, P. and Neaton, J.D. (2000). Relationship of baseline serum cholesterol levels in 3 large cohorts of younger men to long-term coronary, cardiovascular, and all-cause mortality and to longevity. *J. Am. Med. Assoc.* 284, 311–318.

Steinberg, D. and Huttunen, J.K. (1972). The role of cyclic AMP in activation of hormone-sensitive lipase of adipose tissue. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 1, 47–62.

Steinberg, M.D., Zingg, W., and Angel, A. (1962). Studies of the number and volume of fat cells in adipose tissue. *J. Pediatr.* 61, 299–300.

Steinmetz, A., Kaffarnik, H. and Utermann, G. (1985). Activation of phosphatidylcholine-sterol acyltransferase by human apolipoprotein E isoforms. *Eur. J. Biochem. FEBS* 152, 747–751.

Stenger, C., Hanse, M., Pratte, D., Mbala, M.-L., Akbar, S., Koziel, V., Escanyé, M.-C., Kriem, B., Malaplate-Armand, C., Olivier, J.-L., Oster, T., Pillot, T. and Yen, F.T. (2010). Up-regulation of hepatic lipolysis stimulated lipoprotein receptor by leptin: a potential lever for controlling lipid clearance during the postprandial phase. *FASEB J.* *24*, 4218–4228.

Stenger, C., Pinçon, A., Hanse, M., Royer, L., Comte, A., Koziel, V., Olivier, J.-L., Pillot, T. and Yen, F.T. (2012). Brain region-specific immunolocalization of the lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) and altered cholesterol distribution in aged LSR \pm mice. *J. Neurochem.* *123*, 467–476.

Stephan, Z.F. and Yurachek, E.C. (1993). Rapid fluorometric assay of LDL receptor activity by DiI-labeled LDL. *J. Lipid Res.* *34*, 325–330.

Stocks, J. and Miller, N.E. (1999). Analysis of apolipoproteins and lipoproteins by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* *20*, 2118–2123.

Stone, B.G., Evans, C.D., Fadden, R.J. and Schreiber, D. (1989). Regulation of hepatic cholesterol ester hydrolase and acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase in the rat. *J. Lipid Res.* *30*, 1681–1690.

Sugiyama, T., Kumagai, H., Morikawa, Y., Wada, Y., Sugiyama, A., Yasuda, K., Yokoi, N., Tamura, S., Kojima, T., Nosaka, T., Senba, E., Kimura, S., Kadowaki, T., Kodama, T. and Kitamura T. (2000). A novel low-density lipoprotein receptor-related protein mediating cellular uptake of apolipoprotein E-enriched beta-VLDL *in vitro*. *Biochemistry* *39*, 15817–15825.

Sullivan, P.D. (1985). Free radicals of benzo(a)pyrene and derivatives. *Environ. Health Perspect.* *64*, 283–295.

Sureau, F., Chinsky, L., Duquesne, M., Laigle, A., Turpin, P.Y., Amirand, C., Ballini, J.P. and Vigny, P. (1990). Microspectrofluorimetric study of the kinetics of cellular uptake and metabolism of benzo(a)pyrene in human T 47D mammary tumor cells: evidence for cytochrome P1450 induction. *Eur. Biophys. J.* *18*, 301–307.

Takahashi, S., Kawarabayasi, Y., Nakai, T., Sakai, J. and Yamamoto, T. (1992). Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 9252–9256.

Takahashi, S., Suzuki, J., Kohno, M., Oida, K., Tamai, T., Miyabo, S., Yamamoto, T. and Nakai, T. (1995). Enhancement of the binding of triglyceride-rich lipoproteins to the very low density lipoprotein receptor by apolipoprotein E and lipoprotein lipase. *J. Biol. Chem.* *270*, 15747–15754.

Takeuchi, T. and Tsutsumi, O. (2002). Serum bisphenol a concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *291*, 76–78.

Tamura, S. and Shimomura, I. (2005). Contribution of adipose tissue and *de novo* lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* *115*, 1139–1142.

Tamura, Y., Adachi, H., Osuga, J., Ohashi, K., Yahagi, N., Sekiya, M., Okazaki, H., Tomita, S., Iizuka, Y., Shimano, H., Nagai, R., Kimura, S., Tsujimoto, M. and Ishibashi, S. (2003). FEEL-1 and FEEL-2 are endocytic receptors for advanced glycation end products. *J. Biol. Chem.* *278*, 12613–12617.

Tanner, J.. (1955). Obesity and the classification of body build. *Advan. Sci.* *12*, 6–120.

Terpstra, V., van Amersfoort, E.S., van Velzen, A.G., Kuiper, J. and van Berkel, T.J. (2000). Hepatic and extrahepatic scavenger receptors: function in relation to disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *20*, 1860–1872.

Thakker, D.R., Yagi, H., Akagi, H., Koreeda, M., Lu, A.H., Levin, W., Wood, A.W., Conney, A.H. and Jerina, D.M. (1977). Metabolism of benzo[a]pyrene. VI. Stereoselective metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene 7,8-dihydrodiol to diol epoxides. *Chem. Biol. Interact.* *16*, 281–300.

Tolleshaug, H., Hobgood, K.K., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1983). The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: multiple mutations disrupt transport and processing of a membrane receptor. *Cell* *32*, 941–951.

Tontonoz, P., Hu, E. and Spiegelman, B.M. (1995). Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *5*, 571–576.

Toussaint, Jacob, Lagrost, and Chapman (2003). Lipoprotéines et métabolisme lipidique. *In* L'athérosclérose: Physiopathologie, Diagnostics, Thérapeutiques, (Editions Masson).

Travis, A.J. and Kopf, G.S. (2002). The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J. Clin. Invest.* *110*, 731–736.

Tseng, C.-H. (2004). The potential biological mechanisms of arsenic-induced diabetes mellitus. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *197*, 67–83.

Tso, P. and Balint, J.A. (1986). Formation and transport of chylomicrons by enterocytes to the lymphatics. *Am. J. Physiol.* *250*, G715–726.

Uemura, H., Arisawa, K., Hiyoshi, M., Kitayama, A., Takami, H., Sawachika, F., Dakeshita, S., Nii, K., Satoh, H., Sumiyoshi, Y., Morinaga, K., Kodama, K., Suzuki, T., Nagai, M. and Suzuki, T. (2009). Prevalence of metabolic syndrome associated with body burden levels of dioxin and related compounds among Japan's general population. *Environ. Health Perspect.* *117*, 568–573.

van Greevenbroek, M.M. and de Bruin, T.W. (1998). Chylomicron synthesis by intestinal cells *in vitro* and *in vivo*. *Atherosclerosis* *141 Suppl 1*, S9–16.

van Grevenynghe, J., Rion, S., Le Ferrec, E., Le Vee, M., Amiot, L., Fauchet, R. and Fardel, O. (2003). Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit differentiation of human monocytes into macrophages. *J. Immunol.* *170*, 2374–2381.

Vaubourdolle, M. (2007). Structure et métabolisme des lipoprotéines. *In Biochimie Hématologie*,. 173–197. *In* L. m. d. pharmacies (ed.), *Biochimie Hématologie*, vol. 2.

Vaughan, M., Berger, J.E. and Steinberg, D. (1964). Hormone-sensitive lipase and monoglyceride lipase activities in adipose tissue. *J. Biol. Chem.* *239*, 401–409.

Vauhkonen, M., Kuusi, T. and Kinnunen, P.K. (1980). Serum and tissue distribution of benzol[a]pyrene from intravenously injected chylomicrons in rat *in vivo*. *Cancer Lett.* *11*, 113–119.

Vellonen, K.-S., Honkakoski, P. and Urtti, A. (2004). Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity. *Eur. J. Pharm. Sci.* *23*, 181–188.

Véniant, M.M., Zlot, C.H., Walzem, R.L., Pierotti, V., Driscoll, R., Dichek, D., Herz, J. and Young, S.G. (1998). Lipoprotein clearance mechanisms in LDL receptor-deficient “Apo-B48-only” and “Apo-B100-only” mice. *J. Clin. Invest.* *102*, 1559–1568.

Verhulst, S.L., Nelen, V., Hond, E.D., Koppen, G., Beunckens, C., Vael, C., Schoeters, G. and Desager, K. (2009). Intrauterine exposure to environmental pollutants and body mass index during the first 3 years of life. *Environ. Health Perspect.* *117*, 122–126.

Verma, N., Pink, M., Petrat, F., Rettenmeier, A.W. and Schmitz-Spanke, S. (2012). Exposure of primary porcine urothelial cells to benzo(a)pyrene: *in vitro* uptake, intracellular concentration, and biological response. *Arch. Toxicol.* *86*, 1861–1871.

Vestri, H.S., Maianu, L., Moellering, D.R. and Garvey, W.T. (2007). Atypical antipsychotic drugs directly impair insulin action in adipocytes: effects on glucose transport, lipogenesis, and antilipolysis. *Neuropsychopharmacol.* *32*, 765–772.

Vos, J.G., Dybing, E., Greim, H.A., Ladefoged, O., Lambré, C., Tarazona, J.V., Brandt, I. and Vethaak, A.D. (2000). Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Crit. Rev. Toxicol.* *30*, 71–133.

Vries, J.D. (1996). *Food Safety and Toxicity* (CRC Press).

Wahlang, B., Falkner, K.C., Gregory, B., Ansert, D., Young, D., Conklin, D.J., Bhatnagar, A., McClain, C.J. and Cave, M. (2013). Polychlorinated biphenyl 153 is a diet-dependent obesogen that worsens nonalcoholic fatty liver disease in male C57BL6/J mice. *J. Nutr. Biochem.* *24*, 1587–1595.

Walle, T., Walle, U.K., Sedmera, D. and Klausner, M. (2006). Benzo[A]pyrene-induced oral carcinogenesis and chemoprevention: studies in bioengineered human tissue. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* *34*, 346–350.

Wang, X.C., Zhang, Y.X. and Chen, R.F. (2001). Distribution and partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in different size fractions in sediments from Boston Harbor, United States. *Mar. Pollut. Bull.* *42*, 1139–1149.

Wang, Y., Huang, Y., Hobbs, H.H. and Cohen, J.C. (2012). Molecular characterization of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9-mediated degradation of the LDLR. *J. Lipid Res.* 53, 1932–1943.

Wasan, K.M. and Cassidy, S.M. (1998). Role of plasma lipoproteins in modifying the biological activity of hydrophobic drugs. *J. Pharm. Sci.* 87, 411–424.

Welsh, J.B., Zarrinkar, P.P., Sapinoso, L.M., Kern, S.G., Behling, C.A., Monk, B.J., Lockhart, D.J., Burger, R.A. and Hampton, G.M. (2001). Analysis of gene expression profiles in normal and neoplastic ovarian tissue samples identifies candidate molecular markers of epithelial ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 1176–1181.

Weng, W., Brandenburg, N.A., Zhong, S., Halkias, J., Wu, L., Jiang, X.C., Tall, A. and Breslow, J.L. (1999). ApoA-II maintains HDL levels in part by inhibition of hepatic lipase. Studies In apoA-II and hepatic lipase double knockout mice. *J. Lipid Res.* 40, 1064–1070.

Whitaker, R.C., Wright, J.A., Pepe, M.S., Seidel, K.D. and Dietz, W.H. (1997). Predicting obesity in young adulthood from childhood and parental obesity. *N. Engl. J. Med.* 337, 869–873.

van de Wiel, J.A., Fijneman, P.H., Duijf, C.M., Anzion, R.B., Theuws, J.L. and Bos, R.P. (1993). Excretion of benzo[a]pyrene and metabolites in urine and feces of rats: influence of route of administration, sex and long-term ethanol treatment. *Toxicology* 80, 103–115.

Williams, D.L., de La Llera-Moya, M., Thuahnai, S.T., Lund-Katz, S., Connelly, M.A., Azhar, S., Anantharamaiah, G.M. and Phillips, M.C. (2000). Binding and cross-linking studies show that scavenger receptor BI interacts with multiple sites in apolipoprotein A-I and identify the class A amphipathic alpha-helix as a recognition motif. *J. Biol. Chem.* 275, 18897–18904.

Willnow, T.E., Sheng, Z., Ishibashi, S., and Herz, J. (1994). Inhibition of hepatic chylomicron remnant uptake by gene transfer of a receptor antagonist. *Science* 264, 1471–1474.

Willnow, T.E., Hammes, A., and Eaton, S. (2007). Lipoproteins and their receptors in embryonic development: more than cholesterol clearance. *Dev. Camb. Engl.* 134, 3239–3249.

Wislocki, P.G., Wood, A.W., Chang, R.L., Levin, W., Yagi, H., Hernandez, O., Dansette, P.M., Herina, D.M. and Conney, A.H. (1976). Mutagenicity and cytotoxicity of benzo(a)pyrene arene

oxides, phenols, quinones, and dihydrodiols in bacterial and mammalian cells. *Cancer Res.* *36*, 3350–3357.

Withey, J.R., Law, F.C. and Endrenyi, L. (1991). Pharmacokinetics and bioavailability of pyrene in the rat. *J. Toxicol. Environ. Health* *32*, 429–447.

Withey, J.R., Shedden, J., Law, F.C. and Abedini, S. (1993). Distribution of benzo[a]pyrene in pregnant rats following inhalation exposure and a comparison with similar data obtained with pyrene. *J. Appl. Toxicol. JAT* *13*, 193–202.

Withrow, D. and Alter, D.A. (2011). The economic burden of obesity worldwide: a systematic review of the direct costs of obesity. *Obes. Rev.* *12*, 131–141.

World Health Organization (2003). World Health Organization: Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. Report of a Joint World Health Organization/Food and Agriculture Organization of the United Nations Expert Consultation. Geneva Switz. World Health Organ.

Wyne, K.L., Pathak, K., Seabra, M.C. and Hobbs, H.H. (1996). Expression of the VLDL receptor in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *16*, 407–415.

Yamazaki, H., Terada, M., Tsuboi, A., Matsubara, C., Hata, T. and Kakiuchi, Y. (1987). Distribution and binding pattern of benzo(a)pyrene in rat liver, lung and kidney constituents after oral administration. *Toxicol. Environ. Chem.* *15*, 71–81.

Yang, J.J., Roy, T.A. and Mackerer, C.R. (1986). Percutaneous absorption of benzo[a]pyrene in the rat: comparison of *in vivo* and *in vitro* results. *Toxicol. Ind. Health* *2*, 409–416.

Yang, L.-H., Chen, T.-M., Yu, S.-T. and Chen, Y.-H. (2007). Olanzapine induces SREBP-1-related adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Pharmacol. Res.* *56*, 202–208.

Yang, S.K., Roller, P.P. and Gelboin, H.V. (1977). Enzymatic mechanism of benzo[a]pyrene conversion to phenols and diols and an improved high-pressure liquid chromatographic separation of benzo[a]pyrene derivatives. *Biochemistry* *16*, 3680–3687.

Yang, Y., Jiang, Y., Wang, Y. and An, W. (2010). Suppression of ABCA1 by unsaturated fatty acids leads to lipid accumulation in HepG2 cells. *Biochimie* *92*, 958–963.

Ye, X., Kuklenyik, Z., Needham, L.L. and Calafat, A.M. (2006). Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* *831*, 110–115.

Yen, F.T., Mann, C.J., Guermani, L.M., Hannouche, N.F., Hubert, N., Hornick, C.A., Bordeau, V.N., Agnani, G. and Bihain, B.E. (1994). Identification of a lipolysis-stimulated receptor that is distinct from the LDL receptor and the LDL receptor-related protein. *Biochemistry* *33*, 1172–1180.

Yen, F.T., Masson, M., Clossais-Besnard, N., André, P., Grosset, J.M., Bougueleret, L., Dumas, J.B., Guerassimenko, O. and Bihain, B.E. (1999). Molecular cloning of a lipolysis-stimulated remnant receptor expressed in the liver. *J. Biol. Chem.* *274*, 13390–13398.

Yen, F.T., Roitel, O., Bonnard, L., Notet, V., Pratte, D., Stenger, C., Magueur, E. and Bihain, B.E. (2008). Lipolysis stimulated lipoprotein receptor: a novel molecular link between hyperlipidemia, weight gain, and atherosclerosis in mice. *J. Biol. Chem.* *283*, 25650–25659.

Yokoyama, S. (1998). Apolipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *Biochim. Biophys. Acta* *1392*, 1–15.

Yoshimura, N., Kinoshita, M. and Teramoto, T. (2009). Isolation and characterization of apolipoprotein B48-containing lipoproteins with a monoclonal antibody against apolipoprotein B48. *J. Atheroscler. Thromb.* *16*, 740–747.

Yu, K.C. and Cooper, A.D. (2001). Postprandial lipoproteins and atherosclerosis. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *6*, D332–354.

Yuan, G., Al-Shali, K.Z. and Hegele, R.A. (2007). Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment. *CMAJ* *176*, 1113–1120.

Zhu, H., Li, Y. and Trush, M.A. (1995). Characterization of benzo[a]pyrene quinone-induced toxicity to primary cultured bone marrow stromal cells from DBA/2 mice: potential role of mitochondrial dysfunction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *130*, 108–120.

Zimmermann, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., et al. (2004). Fat

mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306, 1383–1386.

Zimmermann, R., Lass, A., Haemmerle, G. and Zechner, R. (2009). Fate of fat: the role of adipose triglyceride lipase in lipolysis. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 494–500.

Zoeller, R.T., Bansal, R. and Parris, C. (2005). Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology* 146, 607–612.

Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P. and Hedrick, M.H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7, 211–228.

Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons pollutants on lipid homeostasis and hepatic lipoprotein receptors

Abstract: Obesity is a multifactorial disorder that represents a significant risk factor for many pathologies including cardiovascular diseases, diabetes and neurodegenerative diseases. Recent epidemiological studies suggest potential obesogenic effects of environmental contaminants, but little information is available on their potential effect on hepatic lipoprotein metabolism.

The objective of this study was to determine the effect of the common environmental pollutants, belonging to polycyclic aromatic hydrocarbon (HAP) on three lipoprotein receptors, the LDL-receptor (LDL-R), the scavenger receptor B1 (SRB1) and the lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) as well as the ATP binding cassette transporters A1 (ABCA1) and G1 (ABCG1) using cell and/or animal models. Immunoblot and immunofluorescence *in vitro* studies revealed that exposure of Hepa1-6 to benzo[a]pyrene (B[a]P) significantly decreased LSR, LDL-R and ABCA1 protein levels, whereas no significant changes in protein levels and LSR activity were observed upon cell treatment with pyrene or phenanthrene. Real-time PCR analysis, lactacystin and chloroquine studies revealed that this effect was due primarily to increased proteasome-mediated degradation rather than to decreased transcription or to increased lysosomal degradation. Furthermore, ligand blots revealed that lipoproteins exposed to B[a]P displayed markedly decreased binding to LSR or LDL-R. C57Bl/6RJ mice were treated with B[a]P (0.5 mg/kg, *i.p.*) every 48 h for 15 days. The increased weight gain observed was accompanied by increased plasma triglycerides and cholesterol levels, increased liver cholesterol content, and decreased LDL-R, ABCA1, ABCG1 and SR-B1 protein levels in B[a]P-treated animals as compared to controls. Correlations observed between hepatic LSR and LDL-R levels in control mice were no longer observed in B[a]P treated mice, suggesting a potential dysregulation of hepatic lipoprotein metabolism. Taken together, these results suggest that B[a]P-induced weight gain may be due its inhibitory action on LSR and LDL-R, as well as ABCA1 and lipoprotein metabolism in the liver, which leads to the modified lipid status in B[a]P-treated mice, thus providing new insight into mechanisms underlying the involvement of pollutants such as B[a]P in the disruption of lipid homeostasis, potentially contributing to dyslipidemia associated with obesity.

Key words: benzo(a)pyrene, cholesterol, proteasome, ATP-binding cassette transporter, dyslipidemia, Obesity

Effet des polluants de type hydrocarbures aromatiques polycycliques sur l'homéostasie lipidique et les récepteurs des lipoprotéines hépatiques

Résumé : L'obésité est une maladie multifactorielle qui constitue un facteur de risque de nombreuses pathologies, notamment les maladies cardiovasculaires, le diabète et les maladies neurodégénératives. Des études épidémiologiques récentes suggèrent un effet obésogène des contaminants environnementaux, mais peu d'informations sont disponibles sur leur effet potentiel sur le métabolisme des lipoprotéines hépatiques. L'objectif de cette étude était de déterminer l'effet de polluants environnementaux de la famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sur trois récepteurs des lipoprotéines, le récepteur des LDL (LDL-R), le *lipolysis-stimulated lipoprotein receptor* (LSR) et le *scavenger receptor* B1 (SR-B1) ainsi que sur les *ATP binding cassette transporter* A1 (ABCA1) et G1 (ABCG1) en utilisant des modèles cellulaires et/ou animaux. Les études par *immunoblots* et immunofluorescence *in vitro* ont révélé que l'exposition de cellules Hepa1-6 au B[a]P diminue de manière significative les taux de protéine LSR, LDL-R et ABCA1, alors qu'aucune modification significative du taux et de l'activité du LSR n'a été observée lors d'une exposition au pyrène ou au phénanthrène. L'analyse en temps réel par PCR et les études avec la lactacystine ont révélé que cet effet était dû principalement à une augmentation de la dégradation par le protéasome plutôt qu'à une diminution de la transcription ou à une augmentation de la dégradation lysosomale. En outre, les *ligand-blots* ont révélé que les lipoprotéines exposées au B[a]P avaient une affinité réduite pour le LSR ou le LDL-R. Des souris C57Bl/6RJ ont été traitées par le B[a]P (0,5 mg / kg, *i.p.*) toutes les 48 h pendant 15 jours. Le gain de poids observé est accompagné d'une augmentation des taux de triglycérides et de cholestérol plasmatiques, du taux de cholestérol hépatique, et d'une diminution du taux de LDL-R et ABCA1 chez animaux traités au B[a]P par rapport aux témoins. Les corrélations observées entre les taux de LSR et de LDL-R hépatiques chez les souris contrôle ne sont plus observées chez les souris traitées au B[a]P, ce qui suggère un dérèglement du métabolisme des lipoprotéines hépatiques. Ces résultats suggèrent que la prise de poids induite par le B[a]P est peut-être liée à son action inhibitrice sur le LSR et le LDL-R, ainsi que sur l'ABCA1 et le métabolisme des lipoprotéines hépatiques, ce qui conduit à un statut lipidique modifié chez les souris traitées au B[a]P, donnant ainsi un nouvel éclairage sur les mécanismes sous-jacents de la contribution des polluants tels que le B[a]P à la perturbation de l'homéostasie lipidique, susceptible de contribuer à la dyslipidémie associée à l'obésité.

MOTS-CLES : benzo(a)pyrène, cholestérol, protéasome, ATP-binding cassette transporter, Dyslipidémie, Obésité