



**HAL**  
open science

# Rôle des récepteurs couplés aux protéines G adrénergiques dans la toxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques

Thomas Déséchalliers

► **To cite this version:**

Thomas Déséchalliers. Rôle des récepteurs couplés aux protéines G adrénégiques dans la toxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Sciences du Vivant [q-bio]. 2016. dumas-01758160

**HAL Id: dumas-01758160**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01758160>**

Submitted on 5 Jun 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.



**THÈSE D'EXERCICE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**  
*sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne*

**THÈSE EN VUE DU**  
**DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

présentée par

**Thomas DÉSÉCHALLIERS**

né le 9 septembre 1991 à Mayenne

---

**Rôle des récepteurs  
couplés aux protéines  
G adrénergiques dans  
la toxicité des  
hydrocarbures  
aromatiques  
polycycliques**

**Thèse soutenue à Rennes  
le 22 janvier 2016**

devant le jury composé de :

**Vincent LAGENTE**

Professeur, Université de Rennes 1 / *Président de jury*

**Aude ALFARES**

Docteur en Pharmacie / *Juge*

**Eric LE FERREC**

MCU, Université de Rennes 1 / *Directeur de thèse*





**THÈSE D'EXERCICE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**  
*sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne*

**THÈSE EN VUE DU**  
**DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

présentée par

**Thomas DÉSÉCHALLIERS**

né le 9 septembre 1991 à Mayenne

---

**Rôle des récepteurs  
couplés aux protéines  
G adrénergiques dans  
la toxicité des  
hydrocarbures  
aromatiques  
polycycliques**

**Thèse soutenue à Rennes  
le 22 janvier 2016**

devant le jury composé de :

**Vincent LAGENTE**

Professeur, Université de Rennes 1 / *Président de jury*

**Aude ALFARES**

Docteur en Pharmacie / *Juge*

**Eric LE FERREC**

MCU, Université de Rennes 1 / *Directeur de thèse*

# SERMENT DE GALIEN



En présence des maitres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples, je jure :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

**Liste des enseignants-chercheurs  
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques  
Université de Rennes 1**

**Année universitaire 2015-2016**

PROFESSEURS

BOUSTIE Joël

BURGOT Gwenola

DONNIO Pierre-Yves

FAILI Ahmad

FARDEL Olivier

FELDEN Brice

GAMBAROTA Giulio

GOUGEON Anne

LAGENTE Vincent

LE CORRE Pascal

LORANT (BOICHOT) Elisabeth

MOREL Isabelle

SERGENT Odile

SPARFEL-BERLIVET Lydie

TOMASI Sophie

URIAC Philippe

VAN DE WEGHE Pierre

VERNHET Laurent

PROFESSEURS ASSOCIES

BUREAU Loïc

DAVOUST Noëlle

PROFESSEUR EMERITE

CILLARD Josiane

MAITRES DE CONFERENCES

ABASQ-PAOFAI Marie-Laurence

ANINAT Caroline

AUGAGNEUR Yoann

BEGRICHE Karima

BOUSARGHIN Latifa

BRANDHONNEUR Nolwenn

BRUYERE Arnaud

BUNETEL Laurence

CHOLLET-KRUGLER Marylène

COLLIN Xavier

CORBEL Jean-Charles

DAVID Michèle

DELALANDE Olivier

DELMAIL David

DION Sarah

DOLLO Gilles

GILOT David

GOUAULT Nicolas

HITTI Eric

JEAN Mickaël  
LECURER Valérie  
LE FERREC Eric  
LE PABIC Hélène  
LEGOUIN-GARGADENNEC Béatrice  
LOHEZIC-LE DEVEHAT Françoise  
MARTIN-CHOULY Corinne  
MINET Jacques  
MOURET-PLEIBER Liza  
NOURY Fanny  
PINEL-MARIE Marie-Laure  
PODECHARD Normand  
POTIN Sophie  
RENAULT Jacques  
ROUILLON Astrid

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

GICQUEL Thomas

ATER

SMIDA Imen  
PASCREAU Gaëtan  
SAVARY Camille

# Remerciements

---

*A mon président de jury,*

**Monsieur Vincent LAGENTE,**

**Professeur de pharmacologie à la Faculté de Pharmacie de Rennes**

Pour l'honneur que vous me faites de présider cette thèse, veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

*A mon directeur de thèse,*

**Monsieur Eric LE FERREC,**

**Maitre de conférences à la Faculté de Pharmacie de Rennes**

Pour m'avoir proposé ce sujet, pour avoir accepté de diriger ce travail et pour le temps que vous m'avez accordé, veuillez trouver ici mes sincères remerciements.

*Au membre du jury,*

**Madame Aude ALFARES,**

**Pharmacien titulaire,**

Pour m'avoir fait partager la passion de ce métier et permis de m'enrichir professionnellement et humainement au sein de votre officine pendant toutes ces années d'études ; et pour le plaisir que vous me faites de participer au jury de cette thèse, je vous remercie chaleureusement.

***A mes parents,***

Pour m'avoir permis de faire des études, vous avez une grande part dans leurs réussites,  
Pour avoir toujours cru en moi et m'avoir soutenu durant toutes ces années,  
Pour vos conseils et encouragements,  
Tout simplement merci pour ce que vous faites pour nous,  
Je vous aime très fort.

***A mes sœurs,***

Merci d'être là.  
Pour tous ces bons moments passés ensemble et ceux à venir...

***A mes grands-parents,***

Merci pour votre exemple, votre affection et votre générosité.

***A toute ma famille,***

Vous tous qui êtes venus en ce jour et pour tous ceux qui n'ont pas pu se déplacer.  
Je tiens fort à vous.

***A Guillaume,***

Un TP a suffi à créer le binôme parfait ! Merci pour cette belle amitié.

***A mes ami(e)s,***

Que ce soit pour les soirées, les week-ends, les vacances, les révisions et tous les autres moments, merci pour tout ce que nous avons pu partager ensemble. En espérant que cela puisse durer encore longtemps.

***A l'équipe de la Pharmacie de la Colmont,***

Un grand merci pour m'avoir accueilli parmi vous, pour avoir participé à ma formation et pour l'expérience que vous m'avez apportée.

Merci pour vos conseils, votre gentillesse et pour tous les bons moments passés ensemble.

***A tous mes collègues de travail,***

Vous m'avez tous apporté, chacun à votre manière, un peu de votre savoir et je vous en remercie sincèrement.

# Table des matières

---

LISTE DES FIGURES.....	14
LISTE DES TABLEAUX .....	15
LISTE DES ABREVIATIONS .....	16
INTRODUCTION .....	20
<b>PARTIE I : LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES .....</b>	<b>21</b>
I.    DEFINITION .....	22
II.   PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES .....	23
III.  CLASSIFICATION .....	25
1.  Classification du CIRC.....	25
2.  Classification de l'UE.....	26
IV.  SOURCES DE CONTAMINATION.....	27
1.  Exposition par l'air .....	28
2.  Exposition par l'eau.....	29
3.  Exposition par l'alimentation.....	29
4.  Exposition professionnelle.....	30
V.   PRODUCTION.....	31
VI.  DEGRADATION .....	31
<b>PARTIE II : TOXICITE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES .....</b>	<b>32</b>
I.    HAPS ET PATHOLOGIES HUMAINES.....	33
1.  Effets cancérogènes.....	33
2.  Toxicité cardiovasculaire.....	34
3.  Immunotoxicité.....	35
4.  Toxicité cutanée.....	36
II.   VOIES ACTIVEES PAR LE RAH .....	37
1.  Le récepteur aux hydrocarbures aromatiques.....	37
a.  Rôles physiologiques.....	37
b.  Activation du RAh .....	39
2.  Bioactivation des HAPs .....	41

a.	Voie des cytochromes.....	43
b.	Voie d'oxydation mono-électronique par les peroxydases .....	44
c.	Voie des quinones .....	45
III.	ACTION SUR LES MEMBRANES .....	48
IV.	ACTION SUR LA SIGNALISATION AMPC DEPENDANTE .....	51
V.	ACTION SUR LA SIGNALISATION CALCIUM-DEPENDANTE.....	52

**PARTIE III : ACTION DES HAP SUR LES RCPG ..... 53**

I.	LES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G .....	55
1.	Définition .....	55
2.	Structure .....	55
3.	Classification .....	56
a.	La famille des récepteurs au glutamate.....	57
b.	La famille de la rhodopsine.....	57
c.	La famille des récepteurs d'adhésion.....	58
d.	La famille des récepteurs Frizzled/TAS2 .....	58
e.	La famille des récepteurs à la sécrétine (secretin like) .....	58
4.	Les protéines G trimériques.....	59
a.	Cycle d'activation de la protéine G .....	59
b.	Sous-types de protéines G .....	59
c.	Effecteurs activés par la protéine G .....	60
i.	Effecteurs des sous-unités $\alpha$ des protéines G .....	60
ii.	Effecteurs des sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G .....	61
II.	LE RECEPTEUR BETA2-ADRENERGIQUE .....	62
1.	Définition .....	63
2.	Ligands physiologiques .....	64
3.	Rôles physiologiques.....	65
a.	Au niveau cardiaque .....	66
b.	Au niveau vasculaire .....	66
c.	Dans les voies pulmonaires.....	67
d.	Au niveau hépatique.....	67
e.	Autres.....	67
4.	Voies de signalisation.....	68
a.	Les voies liées aux protéines G .....	68
b.	Voies indépendantes de la protéine G .....	70
i.	Signalisation via les $\beta$ -arrestines .....	71
ii.	Signalisation via les tyrosines kinases SRC .....	72
iii.	Signalisation via les protéines au motif PDZ.....	73
III.	ACTION DES HAPS SUR LE R $\beta$ 2-AD.....	75
1.	Action directe sur le récepteur .....	75

2.	Désensibilisation du R $\beta$ 2-AD.....	78
a.	Dissociation du complexe R $\beta$ 2-AD/protéine Gs.....	79
b.	Internalisation du récepteur.....	80
c.	La « down-regulation » .....	81
d.	Action des HAPs en faveur d'une désensibilisation du R $\beta$ 2-AD.....	83
<b>PARTIE IV : CONCLUSIONS .....</b>		<b>84</b>
I.	DISCUSSION GENERALE .....	85
II.	EDUCATION THERAPEUTIQUE .....	90
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>		<b>94</b>
<b>ANNEXE.....</b>		<b>111</b>

# Liste des figures

---

Figure 1 : Structures chimiques de quelques hydrocarbures aromatiques .....	22
Figure 2 : Structure chimique du B[a]P (cancérogène) et du pyrène (non cancérogène).....	34
Figure 3 : Activation du RAh par le B[a]P et induction de gènes cibles.....	41
Figure 4 : Principales voies de métabolisation du B[a]P .....	42
Figure 5 : Formation du dérivé diol-époxyde du B[a]P .....	44
Figure 6 : Formation du radical cation du B[a]P.....	45
Figure 7 : Voie des quinones .....	46
Figure 8 : Action du B[a]P sur le remodelage membranaire et ses conséquences (93).....	49
Figure 9 : Etapes de la peroxydation lipidique .....	50
Figure 10 : Structure générale des RCPG .....	56
Figure 11 : Biosynthèse des catécholamines endogènes.....	65
Figure 12 : Présentation des différents types de ligands .....	70
Figure 13 : Notion d'antagoniste, agoniste et agoniste biaisé .....	72
Figure 14 : Activation des ERKs lors de la stimulation d'ADRB2 dans les cellules MEF ou COS-7 .....	73
Figure 15 : Régulation de l'activité des échangeurs $\text{Na}^+/\text{H}^+$ (NHE) par ADRB2.....	74
Figure 16 : Schéma récapitulatif de l'action du B[a]P sur le R $\beta$ 2-AD et le RAh .....	78
Figure 17 : Exemple de masque pouvant être utilisé pour la pratique du sport.....	93

# Liste des tableaux

---

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques (à 20°C) des seize HAPs classés par l'USEPA.....	24
Tableau 2 : Classification par le CIRC et l'UE de plusieurs HAPs, produits et secteurs d'activités émettant des HAPs .....	27
Tableau 3 : Anomalies physiologiques et biochimiques des souris RAh <sup>-/-</sup> .....	38
Tableau 4 : Exemples de gènes cibles du dimère HAP/RAh-ARNT (31,64–77).....	40
Tableau 5 : Effets physiologiques associés à l'activation du R $\beta$ 2-AD sur différents organes (147).....	68

# Liste des abréviations

---

<b>AC</b>	Adénylate cyclase
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AhRR</b>	Aryl-hydrocarbon receptor repressor
<b>AKR</b>	Aldo-céto-réductase
<b>AMPC</b>	Adénosine monophosphate cyclique
<b>AP-2</b>	Adaptator protein 2
<b>ARE</b>	A/U rich element
<b>ARK</b>	Adrenergic receptor kinase
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>ARNT</b>	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>AUF1</b>	A/U rich mRNA-binding/degradation factor 1
<b>β-ARB</b>	beta2-adrenergic receptor mRNA-binding protein
<b>B[a]P</b>	Benzo[a]pyrène
<b>BAX</b>	BCL2-associated X protein
<b>BPDE</b>	B[a]P 7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde
<b>CaR</b>	Calcium receptor
<b>CB</b>	Cannabinoid
<b>CCL</b>	Chemokine (C-C motif) ligand
<b>CCP</b>	Clathrin coated pits
<b>CIRC</b>	Centre international de recherche sur le cancer
<b>CMR</b>	Cancérogène, mutagène, reprotoxique
<b>COMT</b>	Catéchol-O-méthyl transférase
<b>cPLA2</b>	Phospholipase cytosolique A2
<b>CRD</b>	Cystein-rich domain
<b>CRLR</b>	Calcitonin receptor-like receptor
<b>CYP</b>	Cytochrome P
<b>DAG</b>	Diacylglycérol

<b>DMBA</b>	Diméthylbenz(a)anthracène
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
<b>EMT</b>	Epidermal mesenchymal transition
<b>EPAC</b>	Exchange protein factor directly activated by cAMP
<b>ERK</b>	Extracellular signal-regulated kinase
<b>ERN</b>	Espèce réactive de l'azote
<b>ERO</b>	Espèce réactive de l'oxygène
<b>FSHR</b>	Follicle stimulating hormone receptor
<b>GABA</b>	Acide gamma-amino-butyrique
<b>GDP</b>	Guanosine diphosphate
<b>GRK</b>	G-protein-receptor kinase
<b>GRP</b>	G-protein coupled receptor phosphatase
<b>GTP</b>	Guanosine triphosphate
<b>GSTA2</b>	Glutathione S-transferase A2
<b>HAPs</b>	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
<b>HSP</b>	Heat shock protein
<b>ICAM</b>	Intercellular adhesion molecule
<b>IgE</b>	Immunoglobuline E
<b>IL</b>	Interleukine
<b>IP3</b>	Inositol triphosphate
<b>IP3R</b>	Inositol triphosphate receptor
<b>IPCS</b>	International programme on chemical safety
<b>Kd</b>	Constante de dissociation
<b>KDa</b>	Kilo-dalton
<b>LDL</b>	Low density lipoprotein
<b>L-DOPA</b>	L-3,4-dihydroxyphénylalanine
<b>LXR</b>	Liver X receptor
<b>MAO</b>	Monoamine oxydase
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>MEF</b>	Mouse embryonic fibroblast
<b>NADPH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b>NHE</b>	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger

<b>NHERF</b>	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger regulatory factor
<b>NLS</b>	Nuclear localization sequence
<b>NQO1</b>	NAD(P)H deshydrogenase quinone 1
<b>NR4A</b>	Nuclear receptor 4A
<b>NRF</b>	Nuclear respiratory factor
<b>Pa</b>	Pascal
<b>PCB</b>	Polychlorobiphényle
<b>PCDF</b>	Polychlorodibenzofurane
<b>PCDD</b>	Polychlorodibenzodioxine
<b>PDE4</b>	Phosphodiesterase 4
<b>PIP2</b>	Phosphatidyl inositol diphosphate
<b>PKA</b>	Protéine kinase A
<b>PKC</b>	Protein kinase C
<b>PKD</b>	Protein kinase D
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>PM</b>	Particulate matter
<b>RAh</b>	Récepteur aux hydrocarbures aromatiques
<b>Rβ2-AD</b>	Récepteur bêta2-adrénérique
<b>RCPG</b>	Récepteur couplé aux protéines G
<b>SRC</b>	Sarcoma
<b>SREBP1C</b>	Sterol regulatory element binding protein 1C
<b>TAS2</b>	Taste 2 receptor
<b>TCDD</b>	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine
<b>TGF β</b>	Transforming growth factor β
<b>TM</b>	Domaine transmembranaire
<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor
<b>UDPGT6</b>	UDP glucuronosyltransferase 6
<b>UE</b>	Union européenne
<b>UGT</b>	UDP glucuronosyltransferase
<b>USEPA</b>	US environmental protection agency
<b>UTR</b>	Untranslated region
<b>V2R</b>	Vasopressin type 2 receptor

<b>VCAM</b>	Vascular cell adhesion molecule
<b>VLDL</b>	Very low density lipoprotein
<b>XAP2</b>	HBV X-associated protein 2
<b>XRE</b>	Xenobiotic response element

# Introduction

---

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) occupent une place centrale parmi les contaminants de l'environnement. Ce sont des composés produits lors de la combustion incomplète de matières organiques. Issus en grande partie de l'industrie du pétrole, on les retrouve également dans la fumée de cigarette, l'alimentation, ... Ils sont aujourd'hui inscrits sur la liste des produits toxiques par l'Organisation Mondiale de la Santé et la Communauté Européenne. En outre, depuis 1976, l'Agence de Protection de l'Environnement des Etats-Unis les considère comme des polluants prioritaires, du fait de leur omniprésence dans l'environnement et de leur forte toxicité.

Leur influence sur la santé humaine est importante, et de nombreuses études en montrent les conséquences. Ils présentent un pouvoir cancérigène, des effets tératogènes, une immunotoxicité, une toxicité cardiovasculaire, ... La majorité de ces effets est liée à l'activation d'un récepteur cytosolique, le récepteur aux hydrocarbures aromatiques (RAh). Cependant, d'autres récepteurs peuvent entrer en jeu dans les mécanismes de toxicité liés aux HAPs. En effet, il est probable que les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), une superfamille de récepteurs transmembranaires contrôlant les principales fonctions de l'organisme, soient en contact avec les contaminants environnementaux à un moment ou à un autre. Ainsi, il a été démontré que parmi les RCPG, le récepteur bêta2-adrénergique soit une cible privilégiée des HAPs.

Cette thèse a pour sujet le rôle de ces récepteurs, en particulier du récepteur bêta2-adrénergique, dans la toxicité des HAPs. La première partie porte donc sur la description des hydrocarbures aromatiques polycycliques (propriétés, sources de contamination, ...). Elle est suivie d'une synthèse sur les effets toxiques liés à ces contaminants. Dans une troisième partie sont abordés les généralités concernant les récepteurs couplés aux protéines G. Ensuite les récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques sont décrits plus précisément, avec une étude de l'action des HAPs sur ces récepteurs. La dernière partie est dédiée à la discussion et à l'éducation thérapeutique concernant l'exposition aux contaminants de l'environnement.

# **PARTIE I**

## **LES HYDROCARBURES AROMATIQUES**

### **POLYCYCLIQUES**

# I. Définition

Les hydrocarbures sont des composés organiques formés d'atomes de carbone et d'hydrogène. On distingue deux sous-familles : les hydrocarbures aliphatiques qui se présentent sous forme linéaire ou ramifiée (ex : pentane) et les hydrocarbures aromatiques composés de un à plusieurs cycles benzéniques conjugués (Figure 1). Dans ce dernier cas, on parle d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs). Les HAPs représente une famille d'une centaine de composés, divisée en deux catégories : ceux formés de deux à quatre cycles aromatiques (ex : naphthalène, anthracène, pyrène, ...) et les composés de plus de quatre cycles aromatiques (ex : benzo[a]pyrène (B[a]P), indéno(1,2,3-cd)pyrène, ...). Les « dérivés des HAPs » se distinguent par un radical greffé à l'un des noyaux benzéniques (ex : diméthylbenz(a)anthracène (DMBA)). La substitution d'un atome d'hydrogène par un atome de chlore conduit à des hydrocarbures aromatiques polychlorés dans lesquels on distingue le groupe des polychlorobiphényles (PCB) et celui des polychlorodibenzofuranes (PCDF ou furanes) et des polychlorodibenzodioxines (PCDD ou dioxines) dont le chef de file est la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine ou dioxine.

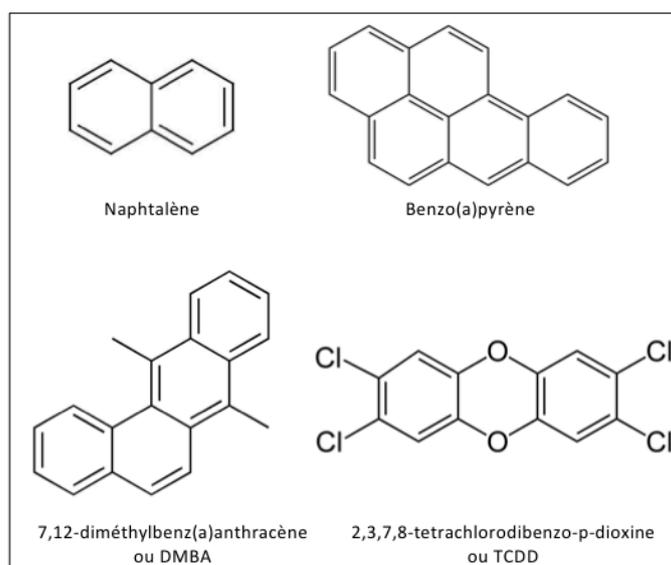


Figure 1 : Structures chimiques de quelques hydrocarbures aromatiques

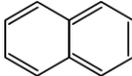
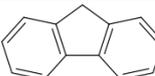
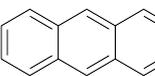
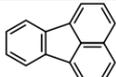
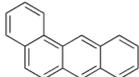
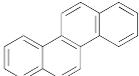
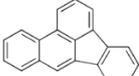
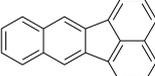
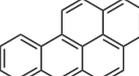
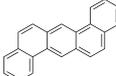
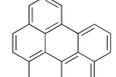
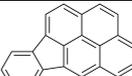
Les HAPs se trouvent généralement sous la forme de mélanges dont la composition diffère selon la source d'émission. Le benzo[a]pyrène, HAP de référence, constitué de cinq cycles aromatiques, est présent de façon quasi-constante dans les mélanges de HAPs auxquels l'Homme est exposé. Cependant, il n'est pas systématiquement le plus présent en terme de quantité. Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) le considère comme un produit cancérigène pour l'Homme (groupe 1) (1).

## II. Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physiques des HAPs varient en fonction de leur masse moléculaire et de leur structure. A l'état pur, les HAPs sont des solides colorés, présents sous forme cristalline à température ambiante. Ils ont un point de fusion supérieur à 100°C et un point d'ébullition élevé, supérieur à 300°C. Les tensions de vapeur des HAPs sont modérément élevées (36,8 Pa) ou faibles ( $1,3 \cdot 10^{-8}$  Pa). Le tableau suivant regroupe les principales propriétés physico-chimiques des seize HAPs d'intérêt prioritaire classés par l'Agence de Protection de l'Environnement Américaine (US Environmental Protection Agency, USEPA) (Tableau 1).

Les HAPs sont des composés lipophiles, une propriété qui augmente avec la complexité de structure de ces polluants. Leur coefficient de partage octanol/eau ( $K_{ow}$ ), qui traduit la répartition d'une molécule d'un soluté entre la phase lipophile (octan-1-ol) et la phase hydrophile (eau), est relativement élevé (entre 3,37 et 6,5), ce qui indique un fort potentiel d'adsorption sur les matières particulaires en suspension dans l'air et dans l'eau, mais aussi sur la matière organique des sols. Ce coefficient est un bon indicateur de la capacité des polluants à pénétrer les membranes biologiques qui sont des bicouches lipidiques (2).

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques (à 20°C) des seize HAPs classés par l'USEPA

Composés	Formule semi-développée	Masse molaire (g.mol <sup>-1</sup> )	Point de fusion (°C)	Point d'ébullition (°C)	Solubilité dans l'eau à 25°C (mg.L <sup>-1</sup> )	Coefficient de partage (log K <sub>ow</sub> )	Tension de vapeur (Pa à 25°C)
Naphtalène		128,2	81	217,9	31	3,37	36,8
Acénaphtylène		150,2	92	270	16,1	4	4,14
Acénaphtène		154,2	95	279	3,8	3,92	1,52
Fluorène		166,2	116,5	295	1,9	4,18	0,715
Phénanthrène		178,2	101	340	1,1	4,57	0,113
Anthracène		178,2	216	342	0,045	4,54	0,0778
Fluoranthène		202,3	108,8	375	0,26	5,22	8,72.10 <sup>-3</sup>
Pyrène		202,3	156	393	0,132	5,18	0,0119
Benzo[a]anthracène		228,3	160,7	400	0,011	5,91	6,06.10 <sup>-4</sup>
Chrysène		228,3	253,8	448	0,002	5,6	8,4.10 <sup>-7</sup>
Benzo[b]fluoranthène		252,3	168	481	0,0015	5,8	6,7.10 <sup>-5</sup>
Benzo[k]fluoranthène		252,3	215	481	0,0008	6	4,12.10 <sup>-6</sup>
Benzo[a]pyrène		252,3	178,1	496	0,0038	6,04	2,13.10 <sup>-5</sup>
Dibenzo[a,h]anthracène		278,3	266,6	524	0,0006	6,75	9,16.10 <sup>-8</sup>
Benzo[ghi]pérylène		268,4	278,3	545	0,00026	6,5	2,25.10 <sup>-5</sup>
Indéno[1,2,3,cd]pyrène		276,03	164	536	0,062	6,6	1,3.10 <sup>-8</sup>

## III. Classification

Les HAPs ont été classés pour leur cancérogénicité par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) ainsi que par l'Union Européenne (UE), cette dernière classification étant la seule à avoir une valeur réglementaire en milieu du travail en France. Des préparations contenant des HAPs et des secteurs d'activités sont également classés par le CIRC et l'UE (Tableau 2). Ces classifications sont établies sur la base de données épidémiologiques et, le cas échéant, d'études *in vivo* sur l'animal ou *in vitro*.

### 1. Classification du CIRC

#### Groupe 1

L'agent ou le mélange est cancérogène pour l'Homme.

#### Groupe 2

2A : l'agent ou le mélange est probablement cancérogène pour l'Homme.

2B : l'agent ou le mélange est un cancérogène possible pour l'Homme.

#### Groupe 3

L'agent (le mélange ou le mode d'exposition) est inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'Homme.

#### Groupe 4

L'agent (le mélange ou le mode d'exposition) n'est probablement pas cancérogène pour l'Homme.

## 2. Classification de l'UE

### **Catégorie 1**

Substances et préparations que l'on sait être cancérogènes pour l'Homme.

### **Catégorie 2**

Substances et préparations pour lesquelles il existe une forte présomption que l'exposition de l'Homme à de telles substances et préparations peut provoquer un cancer ou en augmenter la fréquence.

### **Catégorie 3**

Substances et préparations préoccupantes pour l'Homme en raison d'effets cancérogènes possibles mais pour lesquelles les informations disponibles sont insuffisantes pour classer ces substances et préparations dans la catégorie 2.

Il convient de noter que parmi les HAPs classés pour leur cancérogénicité, ne figure aucun HAP gazeux mais uniquement des HAPs particulaires. Le B[a]P est le seul HAP à avoir été classé dans le groupe 1 par le CIRC.

Tableau 2 : Classification par le CIRC et l'UE de plusieurs HAPs, produits et secteurs d'activités émettant des HAPs

	CIRC	UE
<b>HAP</b>		
Benzo[a]anthracène	2B	2
Benzo[a]pyrène	1	2
Benzo[e]pyrène	2B	2
Dibenzo[a,h]anthracène	2A	2
Benzo[b]fluoranthène	2B	2
Benzo[j]fluoranthène	2B	2
Benzo[k]fluoranthène	2B	2
Chrysène	2B	2
Indéno[1,2,3,c,d]pyrène	2B	NC
Naphtalène	2B	NC
<b>PRODUITS ET SECTEURS D'ACTIVITES</b>		
Goudron et brai de houille	1	1
Huiles minérales	1	1
Suies	1	
Fumée de tabac	1	
Cokerie, aluminium	1	1
Gazéification du charbon	1	1
Fonderie de fer et d'acier	1	
Créosote	2A	
Emissions diesel	2A	2
Raffinage du pétrole	2A	
Extrait noir de charbon	2B	
Emissions d'essence	2B	

## IV. Sources de contamination

La principale source de production des HAPs est la combustion incomplète de matières organiques lors de processus naturels tels que les éruptions volcaniques ou les feux de forêts. Dans ce cas, ils affectent peu l'Homme de part leur diffusion dans la haute atmosphère et donc leur inactivation par les rayons ultraviolets et l'ozone. La principale source de contamination humaine par les HAPs est anthropique : industries (pétrochimique,

aluminerie, aciérie), transport routier (diesel), chauffage domestique (bois, charbon, gaz naturels), cuisson des aliments (grillés), fumée de cigarette (qui contient quatorze types différents de HAPs, dont le benzo[a]pyrène), ...

L'entrée dans l'organisme se fait majoritairement par les voies respiratoire, cutanée et digestive.

## **1. Exposition par l'air**

L'atmosphère est le principal lieu de transport des HAPs grâce à leur capacité à s'adsorber sur des particules en suspension. L'estimation de l'exposition humaine à ces composés est difficile, d'une part parce qu'il existe des variations importantes de concentration en HAPs dans l'atmosphère selon les sites d'étude (de quelques dizaines de  $\text{pg}/\text{m}^3$  en Antarctique à plusieurs  $\text{ng}/\text{m}^3$  dans les grandes villes) (3), et d'autre part parce que l'Homme n'est pas exposé à un seul HAP mais à des mélanges complexes.

Il existe deux types de sources d'émission des HAPs dans l'atmosphère : les sources naturelles (feux de forêts, volcans, ...) et les sources anthropiques. Ces dernières comprennent les émissions industrielles et domestiques, rassemblées sous le terme de sources stationnaires, ainsi que les émissions liées aux modes de transport, qualifiées de sources mobiles. Parmi les sources anthropiques, celle qui a un impact majeur par voie pulmonaire est la fumée de cigarette. Cette dernière augmente considérablement la quantité de HAPs à laquelle l'Homme peut être exposée. Ainsi, l'analyse de la fumée inhalée provenant d'une cigarette à filtre a montré qu'elle contenait quatorze HAPs différents, dont le B[a]P (environ dix ng par cigarette). Cette exposition concerne non seulement les fumeurs actifs mais également les fumeurs passifs. En effet, la fumée non inhalée par un fumeur contient dix fois plus de B[a]P (environ cent ng par cigarette) que la fumée inhalée (4).

## **2. Exposition par l'eau**

Dans l'eau, les HAPs sont généralement présents à l'état de traces, c'est-à-dire à des niveaux de concentration allant du nanogramme par litre à quelques dizaines de microgrammes par litre, et leurs concentrations varient fortement dans le temps et dans l'espace. La contamination de l'eau par les HAPs provient de plusieurs sources : les déversements accidentels d'usines, les précipitations et dépôts atmosphériques, ainsi que la lixiviation. La plupart de ces HAPs sont adsorbés sur les sédiments. Dans l'eau de boisson, les concentrations en HAPs sont de l'ordre de 1 ng/L, à exceptionnellement 11 µg/L dans les zones les plus fortement polluées (5). En France, les eaux destinées à la consommation humaine ne doivent pas contenir plus de 0,01 µg/L de B[a]P (6).

## **3. Exposition par l'alimentation**

Pour un non fumeur, la principale source d'exposition aux HAPs est l'alimentation, en particulier la consommation de viandes et poissons fumés ou grillés sur le feu, de graisses et huiles végétales, ainsi que l'ingestion de produits contaminés par dépôt atmosphérique (végétaux) ou par bioaccumulation (mollusques). Les aliments crus contiennent peu de HAPs, excepté au voisinage des zones polluées, et les taux de ces contaminants se situent généralement entre 0,01 et 1 µg/kg de denrée non cuite. Par ailleurs, la source majeure de contamination des denrées est liée aux procédés de traitement thermique des aliments, notamment le fumage et la cuisson à haute température (grillade, barbecue, ...). Des concentrations supérieures à 100 µg/kg ont été retrouvées dans certaines viandes et poissons fumés, ou cuits au barbecue (7).

## 4. Exposition professionnelle

En 2005, en France, le ministère de l'emploi a estimé que l'exposition professionnelle aux HAPs concernerait environ 1,6 millions de salariés, plaçant les HAPs en tête des composés cancérogènes dans le milieu professionnel. Les industries utilisant des produits dérivés de la houille (goudron et brai de houille) sont les principales sources de contamination professionnelle. Nous pouvons citer, notamment, les cokeries, la production d'électrodes en carbone, l'électrolyse de l'aluminium et la production de silicium, la réfection des fours et dans les aciéries. Par exemple, près des fours à coke, les niveaux de B[a]P dépassent les 400 µg/m<sup>3</sup> (3), comparés avec des niveaux de l'ordre de quelques ng/m<sup>3</sup> dans des situations d'air ambiant classiques. Par ailleurs, des études réalisées par le Programme International sur la Sécurité des substances Chimiques (IPCS) démontrent l'existence de très fortes concentrations dans les milieux professionnels associés au pétrole ou au charbon.

Plusieurs cancers potentiellement liés aux HAPs sont listés dans des tableaux de maladies professionnelles. Seuls certains secteurs d'activités ou certaines modalités d'exposition correspondent à ces tableaux (utilisation de dérivés de la houille, suie de combustion du charbon, certains dérivés pétroliers et leurs produits de combustion). Il s'agit des tableaux 16 bis et 36 bis du Régime Général qui ont fait l'objet d'une mise à jour par un décret de janvier 2009, et du tableau 35 bis du Régime Agricole. Les tableaux 16 bis et 35 bis permettent la reconnaissance pour certains travaux exposant à la houille et au charbon de trois cancers : le carcinome de la peau, le cancer broncho-pulmonaire et les tumeurs des voies urinaires (vessie, voies excrétrices supérieures), sous réserve d'une exposition de dix ans. Le tableau 36 bis fournit quant à lui la liste limitative des travaux susceptibles de provoquer le carcinome de la peau, sous réserve d'une exposition minimale de dix ans. Selon l'INSERM, le risque de cancer du poumon lié à une exposition professionnelle aux HAPs est deux à trois fois plus élevé que celui lié à l'exposition environnementale à ces substances, durant la vie entière.

## V. Production

La production des HAPs, en tant que produit, est peu importante. Elle intervient notamment dans la production des produits utilisés dans la fabrication de teinture et à des fins de recherche et d'analyse. Ainsi, le rejet lié à la production des HAPs est marginal par rapport à leurs rejets totaux. En ce qui concerne le B[a]P, il n'est produit qu'en très petite quantité, par distillation fractionnée de charbon bitumineux (8).

## VI. Dégradation

Les HAPs présentent une grande stabilité. En général, leur demi-vie dans l'air est plus courte que dans le sol. En effet, dans l'atmosphère ils peuvent subir de nombreuses réactions chimiques, comme l'oxydation et la photo-dégradation, qui peuvent les rendre plus toxiques. En revanche, dans le sol, les HAPs adsorbés sur des particules sont relativement protégés des photo-oxydations, ce qui contribue à leur stabilité. Par ailleurs, certaines bactéries, découvertes notamment lors de marées noires, sont connues pour posséder la capacité de dégrader certains HAPs (9). Nous pouvons citer à titre d'exemple *Pseudomonas putida* et *Bacillus cereus*. Ces bactéries sont capables de dégrader des HAPs contenant trois cycles aromatiques. En revanche, les composés contenant cinq cycles ou plus sont plus résistants à cette attaque bactériologique. Néanmoins, plusieurs souches de bactéries ont la capacité de dégrader les HAPs de haut poids moléculaire comme les souches *Mycobacterium* (10). Ainsi, *Mycobacterium sp.* (11–13), *Sphingomonas paucimobilis* (14), *Rhodanobacter* (15) et *Stenotrophomonas maltophilia* (16) sont capables de métaboliser le B[a]P.

# **PARTIE II**

## **TOXICITE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES**

# I. HAPs et pathologies humaines

Actuellement les effets toxiques des HAPs sont imparfaitement connus. Toutefois, les données expérimentales disponibles, notamment chez l'animal, ont montré que certains HAPs pouvaient jouer un rôle dans l'apparition ou l'aggravation de certaines pathologies humaines à cause de leurs effets systémiques (hépatiques, hématologiques, immunologiques, cardiovasculaires et développement d'athérosclérose) et/ou des effets sur la reproduction ainsi que des effets génotoxiques et cancérogènes.

## 1. Effets cancérogènes

Le pouvoir cancérogène des HAPs a été historiquement mis en évidence dès le 18<sup>ème</sup> siècle par les nombreux cancers survenant chez les jeunes ramoneurs anglais. Depuis, de nombreuses études épidémiologiques réalisées chez l'Homme et des études expérimentales chez les rongeurs ont confirmé le puissant pouvoir cancérogène de certains HAPs. Ces contaminants sont capables notamment d'induire des tumeurs pulmonaires, hépatiques, hématologiques, gastriques et des glandes mammaires. Le CIRC a récemment réévalué les effets cancérogènes des HAPs, et en a classé quinze parmi les substances cancérogènes avérés, probables ou peut-être cancérogènes. Le B[a]P est classé cancérogène avéré (groupe 1). Il est également classé CMR de catégorie 2 par l'Union Européenne ; ce qui correspond à de fortes présomptions d'effets cancérogène, mutagène et toxique pour la reproduction. Trois HAPs sont classés comme cancérogènes probables (groupe 2A) : le cyclopenta[c,d]pyrène, le dibenzo[a,h]anthracène et le dibenzo[a,l]pyrène. Onze autres composés sont des cancérogènes possibles (groupe 2B) selon la classification du CIRC. D'autres composés évalués ont été considéré comme inclassables (groupe 3).

Les HAPs ne sont pas tous cancérogènes. Ces HAPs non cancérogènes sont généralement des HAPs de moins de quatre cycles aromatiques, la cancérogénicité étant fréquemment associée à des HAPs contenant quatre à six cycles. Ces derniers possèdent en

effet des configurations structurales particulières appelées région baie et région fjord (Figure 2). Ceci correspond à une zone structurée en anneau complexe formé par un anneau benzo-angulaire et saturé, fusionné avec un anneau aromatique. La structure angulaire formée par les anneaux constitue une gêne stérique favorisant les réactions d'oxydation et la formation de radicaux.

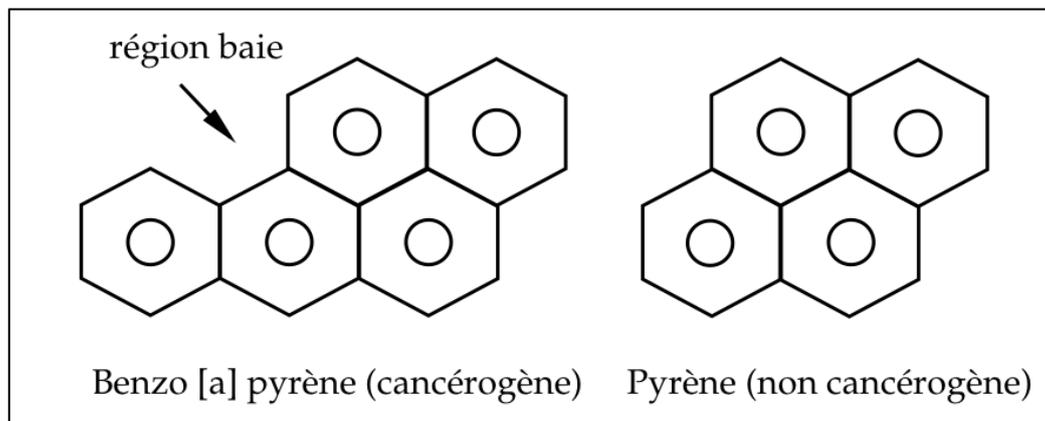


Figure 2 : Structure chimique du B[a]P (cancérogène) et du pyrène (non cancérogène)

## 2. Toxicité cardiovasculaire

Les pathologies cardiovasculaires constituent la deuxième cause de mortalité dans les pays industrialisés, juste après les cancers. Leur prévention est donc primordiale et représente un enjeu majeur de santé publique. Environ un tiers des décès par des maladies cardiovasculaires est lié à l'exposition à la fumée de cigarette, une des sources majeures de contamination par les HAPs (17). En effet, il a été démontré que l'exposition *in utero* entraîne des malformations cardiovasculaires chez le fœtus (18) et qu'un sevrage tabagique chez la femme enceinte permet de diminuer de façon considérable le risque de développer des pathologies cardiovasculaires futures (19). L'exposition professionnelle à ces toxiques augmente considérablement la tendance à développer des maladies cardiovasculaires chez l'Homme (20). Parmi les effets délétères des HAPs sur le système cardiovasculaire figure notamment l'apparition ou l'aggravation des pathologies athéromateuses. Cependant, les mécanismes impliqués sont mal connus, complexes et multiples. Ainsi, ils participeraient au

processus athéromateux par, i) l'accentuation de l'état inflammatoire, ii) l'agression de l'endothélium vasculaire par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives de l'azote (ERN) produites en présence des HAPs, iii) la prolifération des cellules musculaires lisses conduisant à l'augmentation de la taille des plaques d'athérome, iv) l'altération de la structure de certaines lipoprotéines (LDLs, VLDLs), et v) la formation de cellules spumeuses (21–26).

### **3. Immunotoxicité**

Parallèlement à cette action cardiotoxique, les HAPs agissent sur le système immunitaire (27–29). Leur immunotoxicité s'illustre à la fois par leurs propriétés immunostimulatrices et leurs propriétés immunosuppressives. L'action est variable en fonction de la dose. A faible dose, ils seraient immunostimulants (action pro-inflammatoire). En effet, le B[a]P favorise la production de cytokines pro-inflammatoires (IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , ...), de chimiokines (CCL-1, CCL-2, ...) et de molécules d'adhésion (ICAM-1 et VCAM-1) (30–32). Une augmentation de la production d'immunoglobuline E (IgE) dans le liquide broncho-alvéolaire chez les fumeurs est également relevée (33). Par ces effets, les HAPs seraient notamment à l'origine de l'accentuation de la fréquence et de l'intensité des crises chez les personnes allergiques ou asthmatiques en diminuant le seuil de sensibilité aux allergènes (34–36). Tandis qu'à forte dose ils conduiraient à l'immunosuppression. Il a été démontré que les HAPs sont capables d'inhiber les réponses immunitaires à médiation cellulaire et humorale induisant un état d'anergie ou de tolérance. En effet, il est connu que des doses élevées de HAPs sont cytotoxiques pour les lymphocytes (37) et qu'ils provoquent une atrophie des organes lymphoïdes (38). Par ailleurs, le B[a]P inhibe la différenciation des monocytes en macrophages ou en cellules dendritiques et diminue la capacité de phagocytose (39–41).

## 4. Toxicité cutanée

Le récepteur aux hydrocarbures aromatiques (RAh) est exprimé dans toutes les cellules de la peau : les fibroblastes dermiques, les cellules de Langerhans, les mélanocytes et les kératinocytes (42–45). Il semble moduler l'expression des gènes régulant la mobilité cellulaire durant le développement et le renouvellement des tissus cutanés. Ainsi, l'activation du RAh dans les kératinocytes peut induire Slug, un membre de la famille snail/slug, crucial pour la transition épithélial-mésenchymal (EMT, Epidermal Mesenchymal Transition). Ces données illustrent l'implication du RAh dans l'homéostasie épidermique (46). La perturbation de la voie du RAh, lors de l'exposition aux xénobiotiques, pourrait donc favoriser l'apparition de plusieurs lésions de type cancer, dermite de contact ou hyperpigmentation (47).

## II. Voies activées par le RAh

### 1. Le récepteur aux hydrocarbures aromatiques

Les effets délétères des hydrocarbures aromatiques polycycliques nécessitent le plus souvent l'activation d'un récepteur cytosolique, le récepteur aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (RAh). Il a été démontré indispensable, d'une part au métabolisme des HAPs, jouant ainsi un rôle primordial dans l'adaptation de l'organisme à l'exposition aux HAPs, et d'autre part aux voies de signalisation conduisant aux effets toxiques des hydrocarbures aromatiques. Le RAh est une protéine cytosolique dont la taille varie de 95 à 124 KDa selon les espèces (48).

#### a. Rôles physiologiques

Il est désormais prouvé que le RAh joue un rôle important dans les processus physiologiques, malgré le fait qu'on ne connaisse pas précisément son ligand endogène. En effet, ce récepteur ubiquitaire (49) est exprimé de façon précoce lors du développement embryonnaire (50) et présente une haute conservation dans l'évolution (51). En outre, on observe des défauts du développement chez les souris RAh<sup>-/-</sup> (52). Parmi les défauts morphologiques et fonctionnels répertoriés, on peut citer une hypertrophie cardiaque, des anomalies vasculaires et des perturbations de la pression artérielle (53). Le RAh joue également un rôle important au niveau du foie, de la peau, du système reproductif, et durant le développement et la maintenance des systèmes hématopoïétique et immunitaire (52,54–57) (Tableau 3). Enfin, il pourrait réguler les événements liés à la migration et à l'adhésion cellulaire, ceux-ci étant des paramètres importants dans l'apparition et la dissémination des cancers.

Tableau 3 : Anomalies physiologiques et biochimiques des souris RAh<sup>-/-</sup>

Cible	Observations
Foie	Réduction de 50% de la taille
	Fibrose
	Adénocarcinome
	Augmentation du taux d'acides rétinoïques et de leurs dérivés
	Diminution de l'expression basale du CYP1A1 et des UDPGT6
	Augmentation de la transglutaminase II, protéine induite par l'acide rétinoïque et fortement exprimée dans les cellules entrant en apoptose
	Augmentation de TGF $\beta$ 1 et TGF $\beta$ 3, particulièrement dans les zones qui coïncident avec une fibrose
	Hyperprolifération des vaisseaux sanguins près de la veine porte
Système immunitaire	Diminution du nombre de lymphocytes B et T dans la rate et les ganglions lymphatiques
	Infections bactériennes opportunistes, notamment causées par <i>Helicobacter pylori</i> , pouvant aboutir à la mort des souris
Peau	Hyperplasie sévère localisée sur l'épiderme avec hyperkératose
	Expression altérée des cytokines, kératines et intégrines
	Fibrose marquée du derme
Estomac	Hyperplasie du pylore
	Polypes gastriques
Cœur	Hypertrophie cardiaque avec présence de fibrose dans le muscle cardiaque
Poumons	Adénocarcinome
Utérus	Fibroses et calcifications massives

## b. Activation du RAh

Le RAh est un facteur de transcription activé par ses ligands. En l'absence de ligand, le RAh est présent dans le cytoplasme sous forme d'un complexe multiprotéique inactif. En effet, il interagit avec différentes protéines chaperonnes qui servent à maintenir la conformation correcte du récepteur ainsi qu'à assurer sa capacité à fixer les ligands et à renforcer son efficacité transcriptionnelle (58). Ainsi, il interagit directement avec deux protéines HSP90 et une protéine XAP2 (pour HBV X-associated protein 2), et indirectement avec la protéine co-chaperonne p23 via les HSP90. Par conséquent, l'activation du RAh ne résulte pas d'une simple interaction bi-moléculaire du récepteur et de son ligand, mais est plutôt régulée par l'interaction entre le RAh et de nombreux facteurs auxiliaires.

La fixation d'un ligand (ex : B[a]P, dioxine) entraîne une modification de la conformation du RAh (Figure 3), à l'origine du déplacement des protéines chaperonnes et permettant de révéler le signal de localisation nucléaire (NLS) présent dans sa partie N-terminale. Le site d'import nucléaire du RAh est alors libéré et la translocation nucléaire du complexe peut avoir lieu. Il s'ensuit un détachement des protéines chaperonnes conduisant à l'interaction de l'ARNT (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) avec le complexe RAh-B[a]P. La formation de l'hétérodimère RAh/ARNT convertit le complexe en une forme ayant une haute affinité pour l'ADN. L'hétérodimère se lie alors à des régions spécifiques de l'ADN nommées XRE (Xenobiotic Response Element), et situées dans les régions 5'-flanquantes des gènes cibles du RAh. La séquence minimale, ou consensus, reconnue par l'hétérodimère est 5'-T/G-N-G-C-G-T-G-A/C-G/C-A-3'. Le RAh se lie à l'ADN sur la séquence 5'-TNGC-3' et l'ARNT sur la séquence 5'-GTG-3' (59). Cependant il existe sur certains gènes des séquences XRE dites non consensus ou XRE-like. Ce sont des séquences différentes des XRE classiques (ex : GCGGG) et, bien que présentant une mutation sur le noyau central, fixent le dimère RAh/ARNT. Ces modulations permettraient au RAh d'activer différemment les gènes cibles en fonction de son ligand. La liaison d'un ligand au RAh modulerait donc la capacité de ce récepteur à se lier sur les XRE et pourrait favoriser la liaison sur des séquences XRE-like au détriment de gènes comportant des séquences XRE consensus. Ainsi, la paraoxonase-1, enzyme aux effets cardioprotecteurs ne possède que des séquences XRE-like et est induite par la quercétine (agoniste faible) et non par la TCDD. Ces XRE-like

permettraient alors de comprendre les effets protecteurs des polyphénols comme les flavonoïdes (60).

L'activation du RAh induit la transcription et l'expression de nombreuses protéines telles que des enzymes du métabolisme de phase 1 (CYP1A1, 1A2, 1B1) nécessaires à la bioactivation des HAPs en réactifs électrophiles, mais également des enzymes de phase 2, des protéines impliquées dans les voies de transduction, la prolifération cellulaire, le cycle cellulaire, l'apoptose, ainsi que des facteurs de croissance, ... (61–63) (Tableau 4).

Tableau 4 : Exemples de gènes cibles du dimère HAP/RAh-ARNT (31,64–77)

<b>Enzymes du métabolisme</b>	CYP1A1, CYP1A2
	CYP1B1
	UGT1A1
	UGT1A6
	GSTA2
	NQO1
<b>Cytokines</b>	IL-1 $\beta$
	IL-2
	IL-8
	CCL-1
<b>Proto-oncogènes</b>	c-jun
	p21
<b>Protéine pro-apoptotique</b>	Bax
<b>Facteur de transcription</b>	Nrf2
<b>Répresseur du RAh</b>	AhRR

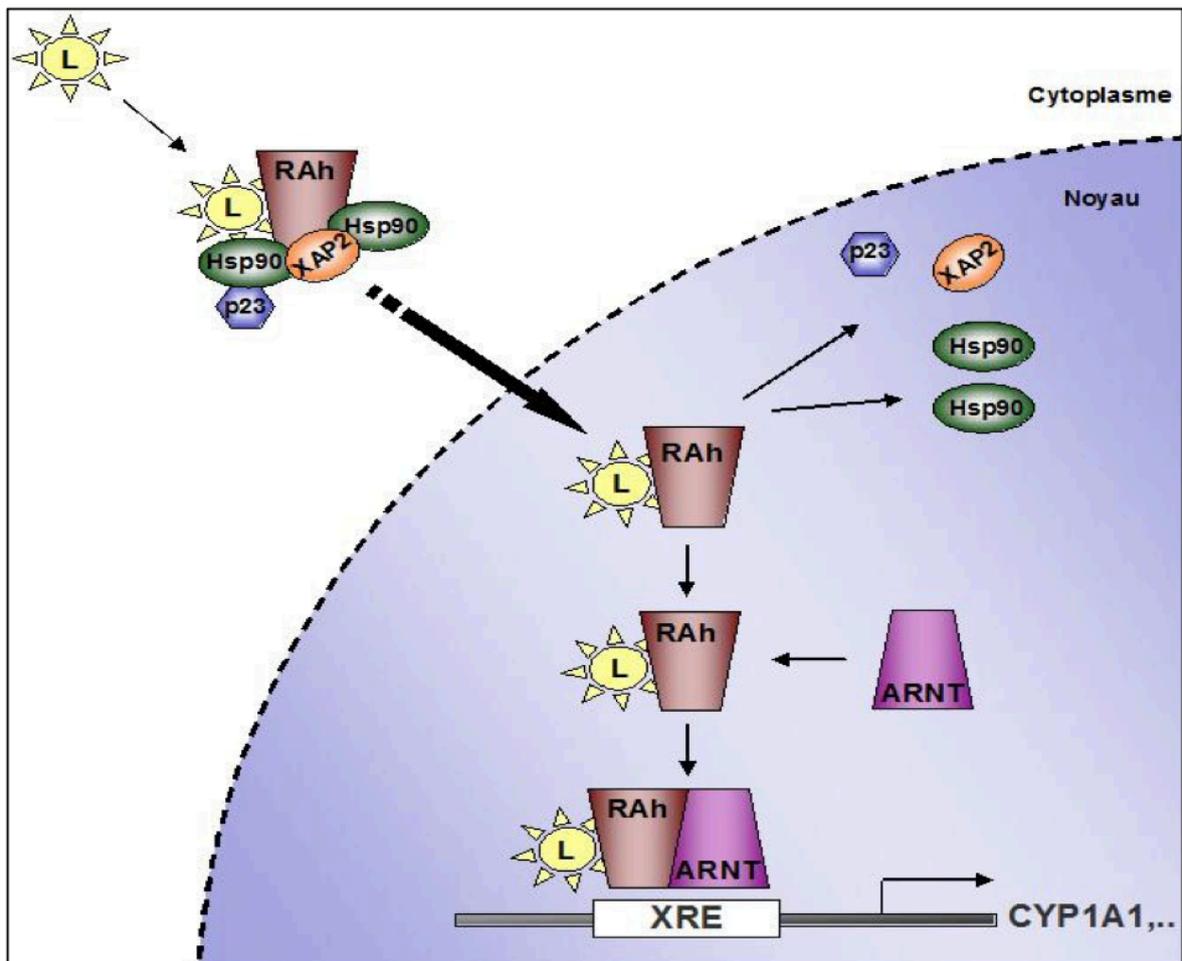


Figure 3 : Activation du RAh par le B[a]P et induction de gènes cibles

## 2. Bioactivation des HAPs

Les HAPs sont métabolisés selon trois voies principales (78) (Figure 4). La plus importante implique la famille des cytochromes P450 (CYP450) qui catalysent la mono-oxygénation des HAPs en époxyde. La seconde voie repose sur la formation d'un radical cation suite à l'oxydation à un électron des HAPs, catalysée par la cytochrome P450 peroxydase. Enfin, la troisième voie correspond à la formation d'ortho-quinones à partir de

catéchols, catalysée par des dihydrodiols déshydrogénases. Dans une moindre mesure, les HAPs peuvent être activés par des prostaglandines synthases et lipooxygénases (79).

Les HAPs, à l'image du B[a]P, subissent une bioactivation générant des métabolites électrophiles capables de se lier à l'ADN, mais également des métabolites capables de générer des espèces réactives de l'oxygène (ERO). La formation de ces dommages génotoxiques a un rôle dans la phase d'initiation du processus de cancérogénèse. Les dérivés métaboliques des HAPs ont une action cancérogène car ils sont capables d'induire des dommages à l'ADN et des mutations au niveau de gènes de contrôle du cycle cellulaire tels que les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. En plus d'avoir un rôle dans la phase d'initiation, le B[a]P a aussi un rôle dans la phase de promotion (80), ce qui le classe parmi les cancérogènes complets. Pour être cancérogène, la molécule d'HAP doit posséder une région baie et être dissymétrique. Cela gouverne les modalités d'oxydation de la molécule en raison des zones de concentration en électrons.

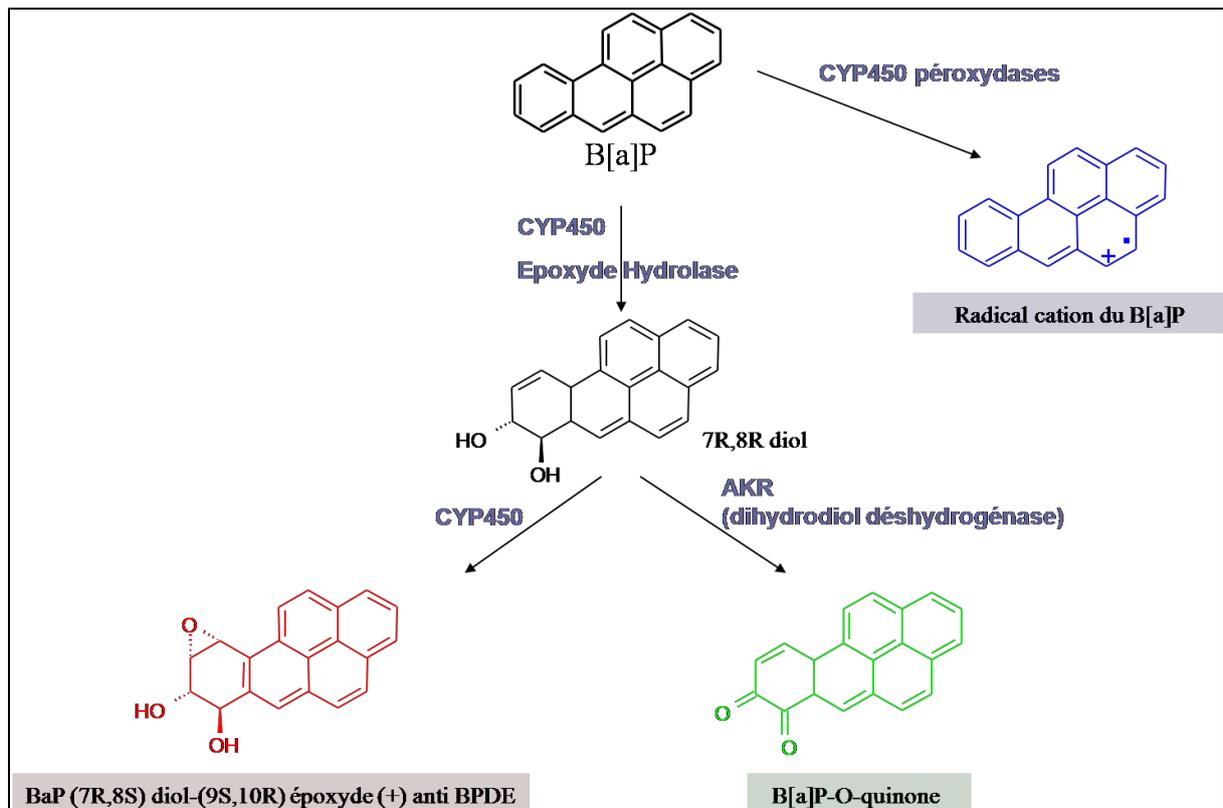


Figure 4 : Principales voies de métabolisation du B[a]P

### a. Voie des cytochromes

Chez l'humain, l'exposition aux HAPs augmente le risque de développer divers cancers (poumons, peau, système hématopoïétique, ...), via la formation d'adduits à l'acide désoxyribonucléique (ADN). Ces composés toxiques sont pro-cancérogènes, c'est-à-dire qu'une biotransformation par les enzymes du métabolisme (en particulier leurs propres cibles géniques, les CYP1A1 et 1B1) est nécessaire pour observer notamment leur effet cancérogène. Cette biotransformation, dont la fonction première est de détoxifier l'organisme, transforme des molécules inertes en intermédiaires réactifs pouvant réagir sur les biomolécules, dont l'ADN (79). Le cytochrome oxyde une double liaison carbone-carbone au niveau du cycle aromatique du HAP. L'époxyde hydrolase convertit alors l'époxyde créé en dihydrodiol. Le cytochrome oxyde ensuite une deuxième double liaison adjacente au groupement diol, menant au composé diol-époxyde. Ces cytochromes permettent la formation de dérivés diol-époxydes, molécules hautement électrophiles qui interagissent avec l'ADN, les lipides et les protéines cellulaires (81), créant ainsi des adduits volumineux pouvant conduire à des mutations et à des modifications du cycle cellulaire (82). L'exemple le plus classique est celui du B[a]P métabolisé notamment par le cytochrome P450 1A1 en diol époxyde : le B[a]P 7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde (ou BPDE) (Figure 5). Ce métabolite très électrophile est capable de réagir avec les bases de l'ADN et de former des adduits dont le plus connu est le BPDE-N2-déoxyguanosine (83). Si les adduits ne sont pas réparés par les systèmes de réparation de l'ADN de l'organisme (Base Excision Repair, Nucleotide Excision Repair), des mutations génétiques irréversibles apparaissent, elles-mêmes responsables de l'initiation des cancers.

Il semble que le pouvoir cancérogène du B[a]P est essentiellement lié au RAh puisque cette cancérogénicité disparaît chez les souris RAh<sup>-/-</sup> (84).

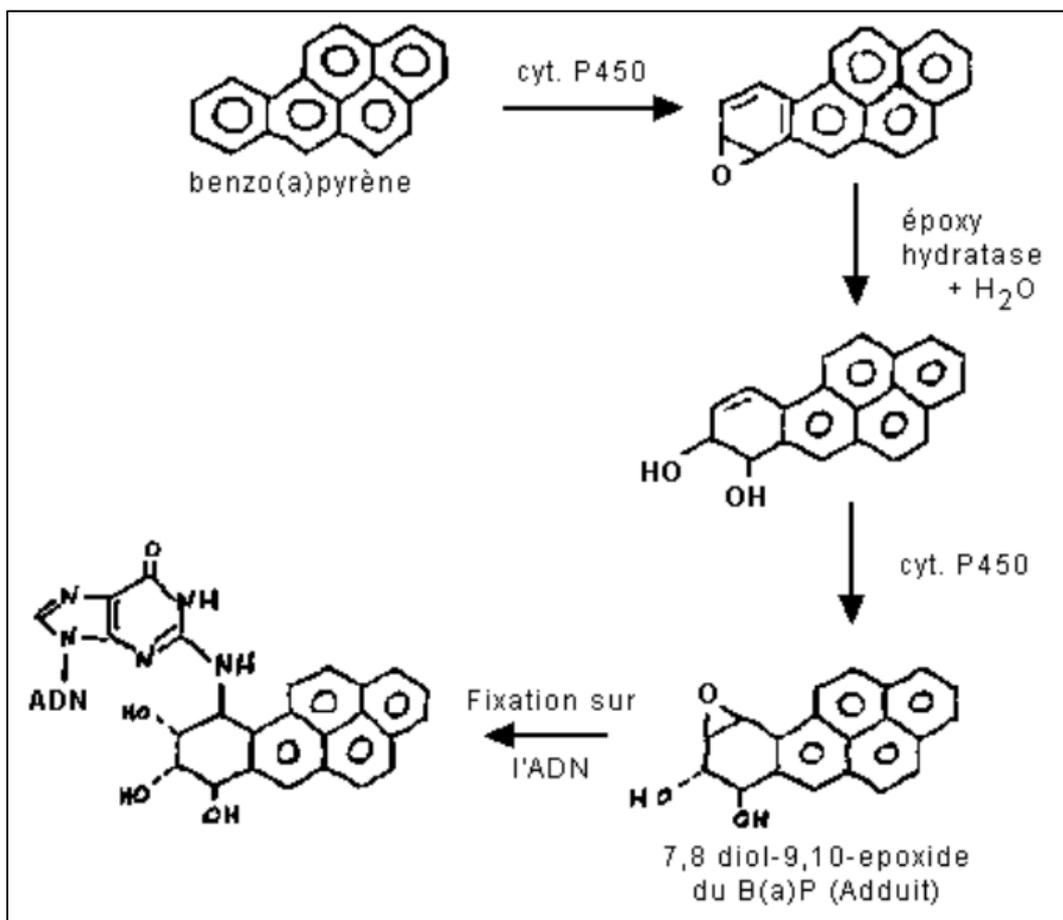


Figure 5 : Formation du dérivé diol-époxyde du B[a]P

### b. Voie d'oxydation mono-électronique par les peroxydases

Cette voie a pour mécanisme l'oxydation à un électron du B[a]P par les peroxydases cellulaires et/ou potentiellement par les cytochromes P450 (Figure 6). Elle conduit à la formation de radicaux cations qui, contrairement au BPDE, sont instables chimiquement. Ils peuvent être générés par des oxydants chimiques, mais également par électrochimie ou de façon enzymatique. La probabilité qu'un HAP perde un électron et donne naissance à un radical cation, ainsi que la réactivité de ce dernier vis-à-vis de l'ADN dépendent de certains facteurs : un potentiel d'ionisation qui doit être faible pour permettre l'arrachement d'un électron, la localisation de la charge sur le radical cation et qui rend cet intermédiaire plus

réactif vis-à-vis d'espèces nucléophiles et une configuration géométrique optimale facilitant leur liaison covalente avec les sites nucléophiles de l'ADN.

Les métabolites générés par cette voie forment également des adduits avec les bases de l'ADN. Ainsi, la voie mono-électronique entraîne la formation d'adduits instables mais joue un rôle majeur dans la génération de sites apuriniques.

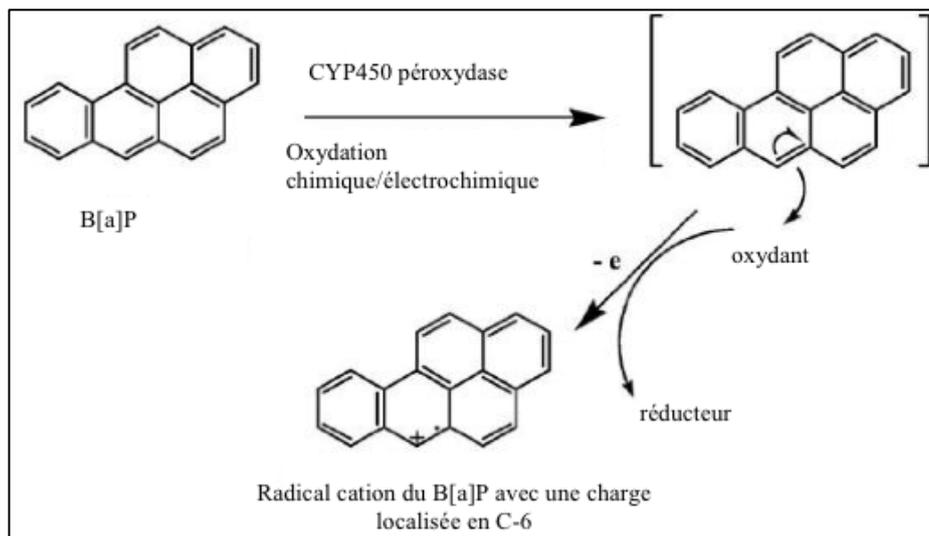


Figure 6 : Formation du radical cation du B[a]P

### c. Voie des quinones

La voie métabolique des quinones met en jeu des dihydrodiol déhydrogénases, enzymes appartenant à la super-famille des aldo-céto-réductases (AKR). La métabolisation du B[a]P-diol par ces enzymes produit un catéchol (Figure 7). Ce catéchol subit deux oxydations à un électron avec la production concomitante d'espèces réactives de l'oxygène pour former des HAP *o*-quinones (85).

La première oxydation produit un anion *o*-semiquinone et du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) suivi par une deuxième oxydation qui conduit à la formation de *o*-quinone et d'un anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (86). En présence d'équivalents réducteurs cellulaires (ex : NADPH),

les HAP *o*-quinones peuvent aussi être réduites en catéchols entraînant des cycles rédox supplémentaires qui amplifient la production d'espèces réactives de l'oxygène :  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . En présence de métaux rédox tels que  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  peut donner le radical hydroxyle ( $\bullet\text{OH}$ ).

Dans l'ADN, ces espèces réactives conduisent à la génération de bases oxydées, notamment au niveau de la guanine (7,8-dihydro-8-oxo-guanine). De plus,  $\bullet\text{OH}$  est à l'origine de cassures de brins (87). Dans les membranes, une augmentation de la peroxydation lipidique (augmentation de la formation de malondialdéhyde) est observée. Les HAPs *o*-quinones sont à l'origine d'une production d'ERO mais peuvent également former des adduits à l'ADN.

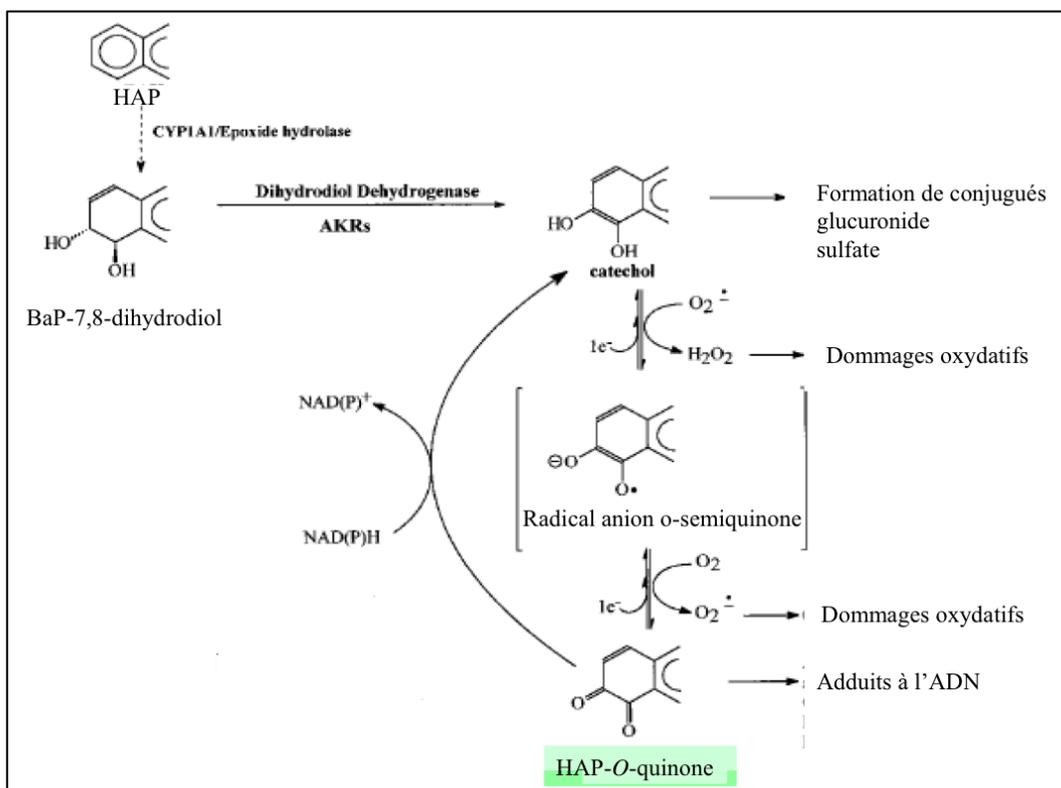


Figure 7 : Voie des quinones

Outre cette action génomique, les HAPs possèdent également des effets non-génomiques, avec des conséquences non-transcriptionnelles. Ainsi, ils sont connus pour agir directement au niveau de la membrane plasmique, avec des conséquences sur la stabilité des membranes cellulaires ; mais ils peuvent également moduler la concentration calcique intracytosolique via l'activation du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique (R $\beta$ 2-AD), associée à une augmentation de la concentration cytosolique en AMPc.

### III. Action sur les membranes

Les HAPs, et plus particulièrement le B[a]P, ont la capacité d'avoir une action au niveau membranaire, tout en passant dans l'espace intracellulaire. En effet, lors d'une exposition à ces contaminants, on peut observer une modification de la composition en cholestérol et en acides gras au niveau des radeaux lipidiques (« lipid raft »). La membrane plasmique possède des microdomaines, appelés radeaux lipidiques, riches en cholestérol et sphingolipides, et pouvant intervenir dans la régulation de la physiologie cellulaire (88–90). Le B[a]P induit une déplétion en cholestérol dans ces microdomaines, en lien avec une réduction de l'expression d'une enzyme, la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA réductase (HMG CoA réductase). Cette dernière est l'enzyme clé de la voie métabolique du mévalonate, impliquée dans la production de cholestérol. La réduction de l'expression enzymatique de l'HMG CoA réductase se fait par deux voies principales. La première implique le RAh, tandis que la deuxième met en jeu une augmentation de la production CYP-dépendante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le remodelage membranaire ainsi induit par le B[a]P régule l'alcalinisation intracellulaire, étape préalable au phénomène d'apoptose cellulaire (Figure 8). En effet, l'action du B[a]P au niveau membranaire entraîne l'activation du Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger 1 (NHE1), un transporteur membranaire sensible aux modifications de la fluidité membranaire. En outre, le B[a]P inhibe l'expression de deux facteurs de transcription impliqués dans la biosynthèse du cholestérol et des acides gras : le Liver X Receptor (LXRβ) et le Sterol Regulatory Element-Binding Protein (SREBP1c). Les radeaux lipidiques sont également impliqués dans le processus de mort cellulaire via le recrutement de récepteurs de mort (91), ou en modulant le stress oxydatif (92). Enfin, le phénomène d'apoptose induit par le B[a]P passe également par la voie p53-dépendante, déclenchée par des dommages sur l'ADN (93,94).

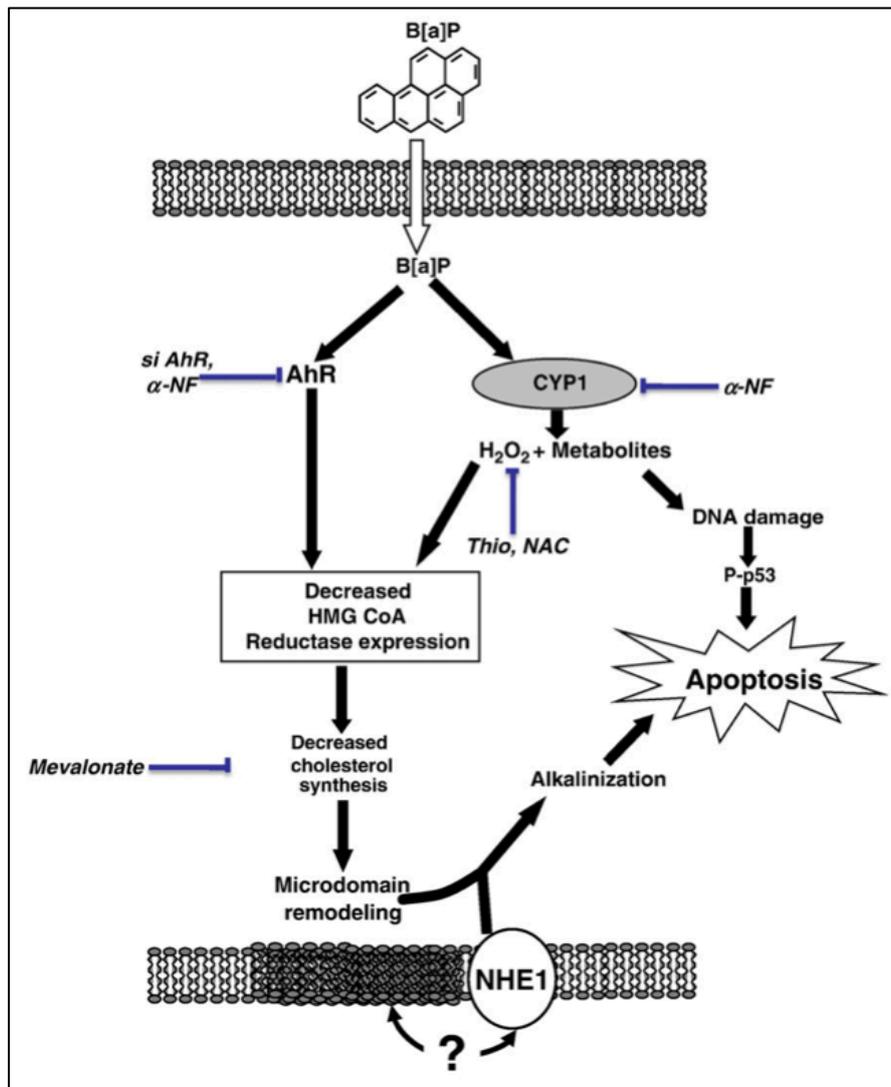


Figure 8 : Action du B[a]P sur le remodelage membranaire et ses conséquences (93)

Par la formation de radicaux libres, les HAPs vont provoquer un stress oxydant. Ces radicaux libres sont des molécules chimiques instables, donc très réactives, produites lors de réactions avec l'oxygène et qui provoquent des dommages cellulaires sur l'organisme. La peroxydation lipidique (Figure 9) correspond à l'oxydation des lipides insaturés par l'intermédiaire des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Toutes les structures de la cellule sont touchées par la peroxydation lipidique, et particulièrement les membranes. Elle a notamment pour conséquence une diminution de la fluidité membranaire et une augmentation de sa perméabilité, aboutissant à une altération de sa structure et de ses

fonctions. Elle est également à l'origine d'une perturbation de l'activité enzymatique et de la fonction de certains récepteurs membranaires, dont les RCPG. Au total, il y a une altération cellulaire pouvant aboutir à des perturbations de fonctionnement de certains organes.

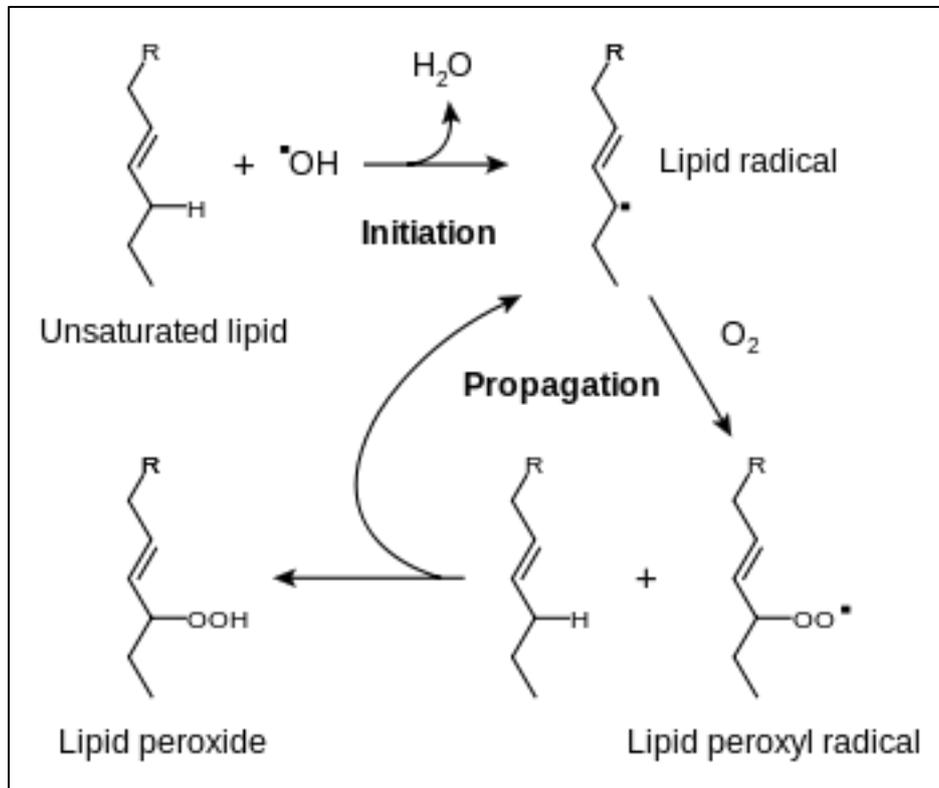


Figure 9 : Etapes de la peroxydation lipidique

## IV. Action sur la signalisation AMPc dépendante

L'AMPc est un second messager intracellulaire retrouvé dans de nombreuses voies de signalisation et permettant de relayer les réponses hormonales lors de divers processus biologiques. Il est responsable de l'activation de plusieurs effecteurs tels que la protéine kinase AMPc-dépendante (PKA), une famille de canaux ioniques membranaires (cAMP-gated channel) et la famille des protéines EPAC-1 et -2 (Exchange Protein factor directly Activated by cAMP), dont l'activation conduit à l'élévation de la concentration calcique intracytosolique (95,96).

A travers leurs expériences, *Vogel et al.* ont montré que la TCDD, un hydrocarbure aromatique halogéné, est capable d'augmenter le taux intracellulaire d'AMPc, via l'activation d'une protéine G (97). Parallèlement à cela, il est connu que l'AMPc peut moduler l'activité du RAh, en agissant en l'absence de ses ligands. En effet, il a été démontré qu'une augmentation du taux d'AMPc dans les cellules Hepa1 conduit, même en l'absence de ligands, à la translocation du RAh dans le noyau et à sa liaison à l'ADN sans l'intervention d'ARNT (98). En outre, l'AMPc inhiberait la formation du complexe RAh/ARNT, responsable des effets toxiques des HAPs. Ainsi, le B[a]P agirait sur l'AMPc de façon indépendante du RAh.

## V. Action sur la signalisation calcium-dépendante

Actuellement, il est démontré que les HAPs perturbent l'homéostasie calcique en induisant sa libération du réticulum endoplasmique et/ou en inhibant sa recapture au sein de l'organite. L'augmentation de la concentration calcique intracellulaire, bi-phasique, est indépendante de la structure des HAPs et du fait qu'ils soient ligands ou non du RAh : le B[a]P (ligand du RAh) comme le pyrène (non ligand du RAh) entraînent une augmentation de calcium.

Une phase d'augmentation tardive et soutenue de calcium est observée dans les cellules exposées aux HAPs. Elle est principalement dépendante des métabolites des HAPs et donc indirectement du RAh. Ainsi, seuls les HAPs ligands forts du RAh, tel que le B[a]P, aurait la possibilité de maintenir une augmentation importante du calcium. Cette capacité pour un HAP d'augmenter de façon soutenue le calcium intracellulaire serait corrélée à un fort effet immunotoxique et cancérigène (99).

Par ailleurs, une voie indépendante du RAh serait plutôt impliquée dans l'augmentation rapide du calcium intracellulaire. En effet, il a été montré que 1) les ligands faibles du RAh ont des effets calciques similaires aux ligands forts du RAh ; 2) l' $\alpha$ -naphthoflavone (antagoniste du RAh) et son isoforme, la  $\beta$ -naphthoflavone (agoniste du RAh), provoquent une augmentation calcique ; et 3) la diminution du taux de protéines du RAh n'a aucune influence sur l'augmentation du signal calcique provoquée par le B[a]P (100,101). Cette étape est essentielle à la translocation et à l'activité transcriptionnelle du RAh. En effet, l'augmentation de la concentration calcique induite par les HAPs est impliquée dans l'induction du CYP1A1 et de la chimiokine CCL1 (31,102).

Malgré l'indépendance du RAh, il y a une étroite relation entre ce récepteur, ses fonctions et la signalisation calcique intracellulaire. En effet, l'activation du RAh implique la signalisation calcique : la voie calcique régule celle du RAh.

# **PARTIE III**

## **ACTION DES HAPs SUR LES RCPG**

La superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) est de loin la plus importante famille de récepteurs chez l'Homme. C'est plus de 800 gènes qui correspondent à 2% du génome. Actuellement environ 360 RCPG sont caractérisés et 240 ligands identifiés. Ces récepteurs, présents dans tous les systèmes physiologiques chez l'Homme, permettent le contrôle de nombreuses fonctions de l'organisme.

Depuis toujours l'Homme est continuellement exposé aux contaminants de l'environnement, notamment aux hydrocarbures aromatiques polycycliques. Mais le cas est encore plus vrai dans notre civilisation moderne, où innovation industrielle et croissance démographique accentuent cette exposition.

Il est donc plus que probable que les RCPG se retrouvent en contact à un moment ou un autre avec ces contaminants. La littérature a d'ailleurs apporté certaines preuves d'une interaction à différents niveaux entre les contaminants environnementaux et les RCPG. Tout d'abord, il a été montré que les particules urbaines présentent un effet « like » au niveau des récepteurs à l'angiotensine 1 (103). Ce même effet est constaté sur les R $\beta$ 2-AD lors d'une exposition au B[a]P. Ensuite, des phénomènes de compétition avec les ligands physiologiques existent. On peut citer l'exemple des phtalates qui se lient sur les récepteurs CB1, et entrent ainsi en compétition avec les cannabinoïdes (104). Un autre mécanisme, celui de la désensibilisation, est retrouvé lors de l'interaction des HAPs avec le R $\beta$ 2-AD et du rediocode A, un insecticide, avec le récepteur Methuselah (105). Enfin, la fixation d'un ligand sur un RCPG peut provoquer une modification de l'expression cellulaire. Ainsi, le bisphénol A diminue le taux de protéines correspondant au récepteur dopaminergique D3 (106). En outre, le 4-nonylphénol diminue l'expression protéique du récepteur dopaminergique 1A et augmente celle du récepteur dopaminergique D2 (107).

# I. Les récepteurs couplés aux protéines G

## 1. Définition

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), famille de protéines à sept hélices transmembranaires couplées à une protéine G, constituent la plus grande famille de récepteurs membranaires chez l'Homme. Ils sont ubiquitaires et contrôlent les principales fonctions de l'organisme tels que l'odorat, le goût, la vision, ainsi que la réponse cellulaire aux hormones et neurotransmetteurs (108). Il a été démontré qu'environ mille gènes codent ces récepteurs, ce qui représente environ 2% du génome humain (109). Ils sont activés par de nombreux ligands comme la lumière, des monoamines (adrénaline, sérotonine), des acides aminés (acide glutamique), des glycoprotéines, des lipides, des nucléosides ou nucléotides (adénosine, ATP, ...). Cela aboutit à de multiples voies de signalisation qui sont autant de cibles thérapeutiques dans divers domaines (cancer, maladies cardiovasculaires et du système nerveux, diabète, obésité, inflammation, ...). La transmission de la majorité des signaux cellulaires à travers la membrane plasmique se fait par l'intermédiaire des RCPG (110). Ainsi, toute perturbation dans leur fonctionnement peut conduire à des pathologies comme l'allergie, l'hypertension artérielle, la maladie d'Alzheimer ou encore la schizophrénie (111). De nombreux médicaments sont agonistes ou antagonistes des RCPG qui représentent la cible d'environ 50% d'entre eux (112).

## 2. Structure

Tous les RCPG possèdent une structure générale identique, malgré une faible homologie de séquence (113). Ils sont composés d'une région N-terminale extracellulaire qui peut faire l'objet de modifications post-traductionnelles de type N-glycosylation, de sept domaines (hélices alpha) transmembranaires (TM 1 à 7) liés par 3 boucles extracellulaires (E1, E2 et E3) et 3 boucles intracellulaires (I1, I2 et I3) et d'une région C-terminale

intracellulaire. Cette dernière peut être phosphorylée sur différents résidus par la kinase A, la protéine kinase C ou les GRK (G-protein-receptor kinase). Elle possède parfois des sites d'ancrages lipidiques dans la membrane (création d'une quatrième boucle, I4) qui résultent d'une modification réversible de cystéines par palmitoylation. Le palmitate interagit avec une molécule de cholestérol (114). On peut également retrouver un ou plusieurs ponts disulfures entre les boucles E1 et E2 (Figure 10).

Dans l'espace, les segments TM6 et TM7 sont proches des segments TM1 et TM2. Cela confère aux RCPG une forme de « panier » avec une poche hydrophobe au niveau de la membrane plasmique. Cette poche est impliquée dans l'activation du récepteur par son ligand.

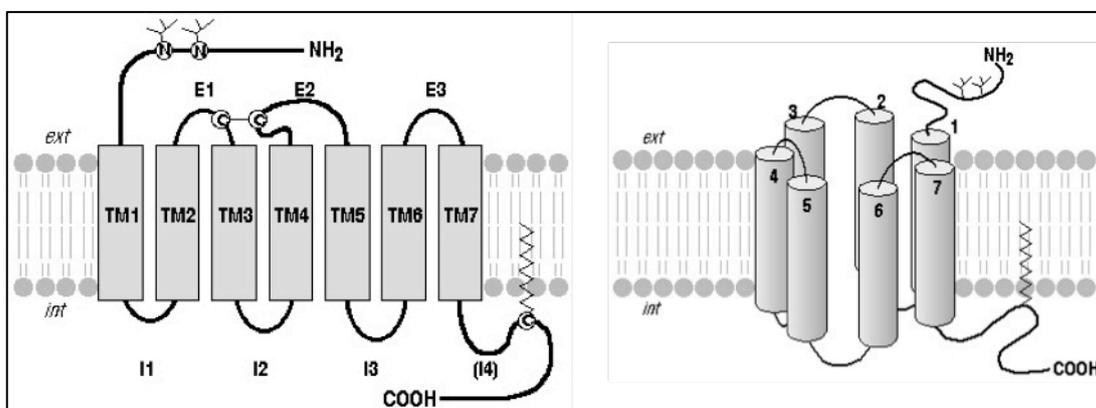


Figure 10 : Structure générale des RCPG

### 3. Classification

La superfamille des RCPG est l'une des plus importante famille de protéines chez les vertébrés, avec plus de mille récepteurs différents. Ces derniers présentent une grande diversité en terme de structure et de fonction, tout en partageant des caractéristiques structurales communes. Plusieurs classifications existent, chacune se basant sur des critères différents, notamment l'homologie de séquence. La classification de Fredriksson, reposant

sur les liens phylogénétiques entre les différents RCPG, les regroupe en cinq groupes : Glutamate, Rhodopsine, Adhesion, Frizzled et Secretin. L'ensemble constituant le système GRAFS (115,116).

#### **a. La famille des récepteurs au glutamate**

Cette famille comprend les récepteurs métabotropiques au glutamate, les récepteurs à l'acide  $\gamma$ -amino-butérique (GABA), le récepteur sensible au calcium (CaR) et les récepteurs de type TAS1 impliqués dans la liaison des molécules gustatives. La liaison du ligand a lieu au niveau de la région N-terminale. Celle-ci est de taille importante (280 à 580 acides aminés) (117) et permet de créer une structure bilobée, site de fixation du ligand (118,119). Ces récepteurs ont en commun une région riche en cystéine (CRD) potentiellement importante dans le processus d'activation.

#### **b. La famille de la rhodopsine**

Elle représente 80% des RCPG et compte plus de 700 membres, ce qui en fait la plus importante famille pour ces récepteurs. Ces derniers possèdent des liens phylogénétiques avec la rhodopsine qui est le premier récepteur à sept domaines transmembranaires ayant été cristallisé grâce aux travaux de Palczewski sur la rhodopsine bovine (120). Le site de liaison du ligand correspond à une poche hydrophobe située au milieu des domaines transmembranaires. La plupart du temps, on retrouve certaines caractéristiques structurelles communes, tel que le motif NSxxNPxxY dans le domaine transmembranaire TM7 ou encore le motif DRY ou D(E)-R-Y(F) à la frontière entre le domaine TM3 et la boucle intracellulaire. Cependant, quelques récepteurs appartenant à cette famille font exception à la règle et possèdent d'autres régions conservées, ce qui permet de les lier à la famille de la rhodopsine. Par exemple, certains vont lier leurs ligands par leur extrémité N-terminale comme les récepteurs aux hormones glycoprotéiques ; ou via à la fois le domaine N-terminal et les domaines transmembranaires tel que le récepteur à la vasopressine V2R. Pour une

classification plus précise, cette famille est divisée en quatre groupes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ) et treize sous-groupes. Le groupe  $\alpha$  regroupe les récepteurs liant les amines, les prostaglandines, ... Le groupe  $\beta$  contient les récepteurs aux peptides, alors que le groupe  $\gamma$

### **c. La famille des récepteurs d'adhésion**

L'extrémité N-terminale de ces récepteurs est formée par la répétition de domaines. C'est notamment le cas pour les récepteurs de la famille EGF-7TM, impliqués dans le processus d'adhésion cellulaire, avec la répétition de domaines type EGF (EGF-like modules). La taille du récepteur est alors fonction du nombre de répétitions des domaines.

### **d. La famille des récepteurs Frizzled/TAS2**

Cette famille englobe les récepteurs de Wnt, une glycoprotéine, ou récepteurs Frizzled (FRZ1-10). Ils sont essentiellement impliqués dans la régulation de la polarité cellulaire et tissulaire, le développement embryonnaire, la formation des synapses, la régulation de la prolifération, et une multitude d'autres processus rencontrés au cours du développement et après (121,122). Elle inclut également les récepteurs de type TAS2 (Taste receptor de type 2), impliqués dans le goût et plus particulièrement l'amertume (123).

### **e. La famille des récepteurs à la sécrétine (secretin like)**

Cette famille comprend les récepteurs à la sécrétine, mais également les récepteurs à la calcitonine, les récepteurs CRLR (Calcitonin receptor-like receptor) et les récepteurs au glucagon. Ils possèdent tous une extrémité N-terminale de taille importante (60 à 80 acides aminés), riche en résidus cystéine, permettant la liaison du ligand au récepteur. La plupart des ligands sont de poids moléculaires élevés, par exemple les hormones peptidiques (124).

## 4. Les protéines G trimériques

Les protéines G trimériques permettent la transduction de signaux transmembranaires. Ce sont des protéines à activité GTPase qui correspondent au principal partenaire intracytoplasmique des RCPG. Les protéines G trimériques interagissent avec les RCPG par l'intermédiaire de quelques résidus amino-acyles localisés principalement sur les boucles intracellulaires 2 et 3, et sur la partie proximale de l'extrémité C-terminale. Le complexe que forme la protéine G est composé de trois chaînes peptidiques : les sous-unités alpha ( $G\alpha$ ), bêta ( $G\beta$ ) et gamma ( $G\gamma$ ). Les sous-unités  $G\beta$  et  $G\gamma$  sont étroitement liées et fonctionnent seulement en tant que complexe (dimère  $\beta\gamma$ ).

### a. Cycle d'activation de la protéine G

Au repos, le site catalytique de la sous-unité  $\alpha$  du trimère  $\alpha\beta\gamma$  est occupé par une molécule de GDP. La liaison d'un agoniste au récepteur induit l'activation des protéines G trimériques concrétisée par une diminution de l'affinité de  $\alpha$  pour le GDP et une augmentation d'affinité pour le GTP. Il se produit un échange entre le GDP, préalablement fixé, et le GTP cytosolique. L'occupation de  $\alpha$  par le GTP induit la dissociation de  $\alpha$  et  $\beta\gamma$  qui peuvent chacune interagir avec des effecteurs, enzymes et canaux ioniques, pour générer des messagers intracellulaires. Cependant, l'activité GTPasique de  $\alpha$  hydrolyse rapidement le GTP en GDP, et  $\alpha$  se retrouve occupé par le GDP. Ainsi,  $\alpha$ , perdant son affinité pour l'effecteur mais récupérant son affinité pour  $\beta\gamma$ , se réassocie avec  $\beta\gamma$  pour reformer le trimère  $\alpha\beta\gamma$  à nouveau disponible pour un nouveau cycle d'activation.

### b. Sous-types de protéines G

L'existence d'un grand nombre de sous-unités (au moins vingt sous-unités  $\alpha$ , cinq sous-unités  $\beta$  et treize sous-unités  $\gamma$ ), codées par des gènes distincts, est à l'origine d'une

diversité importante du trimère  $\alpha\beta\gamma$  (125). La classification des protéines G trimériques reste basée sur les analogies de structure des sous-unités  $\alpha$ , avec les familles Gs, Gi, Gq et G12.

Une sous-famille de protéine G peut être activée par différents RCPG. Ainsi, la protéine Gs est activée par de nombreux récepteurs tels que les récepteurs bêta-adrénergiques, le FSHR, le récepteur à la calcitonine, le récepteur au glucagon, ... Réciproquement, le même RCPG peut activer plusieurs sous-familles de protéines G. Par exemple, le  $R\beta 2$ -AD est lié classiquement à une protéine Gs, mais il peut également se lier aux protéines Gq et Gi (126,127).

### **c. Effecteurs activés par la protéine G**

La spécificité de la signalisation via les RCPG est déterminée par l'isoforme de la protéine G.

#### **i. Effecteurs des sous-unités $\alpha$ des protéines G**

Les principaux effecteurs modulés par l'interaction avec les sous-unités  $\alpha$  des protéines G trimériques sont des systèmes enzymatiques, générant des médiateurs intracellulaires, ainsi que canaux ioniques. Une fois dissociée du complexe  $\alpha\beta\gamma$ , la sous-unité  $G\alpha$  va directement activer différentes classes d'effecteurs. Les adénylates cyclases (AC) et les phospholipases C (PLC) représentent les cibles principales. L'activation de la PLC ou de l'AC mène à la production de messagers secondaires correspondants, à savoir l'AMPc pour l'AC, l'IP3 et le DAG pour la PLC. Ces messagers vont alors activer de nouveaux effecteurs entraînant ainsi l'amplification du signal. A titre d'exemple, la production d'IP3 et DAG conduit à la mobilisation des stocks de  $Ca^{2+}$  et à l'activation des PKC.

## ii. Effecteurs des sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G

Le dimère  $G\beta\gamma$  est impliqué dans l'activation de nombreux effecteurs tels que : l'AC, la PLC, la calmoduline, les canaux calciques, les GRK, la protéine kinase (PKD), la tubuline, le phosphatidyl-inositol, ...

## II. Le récepteur bêta2-adrénergique

Les RCPG peuvent être la cible des contaminants de l'environnement, en particulier des HAPs. Cependant, dans les parties suivantes, seul le R $\beta$ 2-AD sera étudié. En effet, il représente une des cibles privilégiées des HAPs. Ainsi, *Larue et Kato* ont démontré que l'exposition des rats à la fumée de cigarette provoquait une diminution du nombre de R $\beta$ 2-AD dans la sphère cardiaque (128). De la même façon, le nombre de R $\beta$ 2-AD à la surface des lymphocytes humains diminue après exposition à la fumée de cigarette (129,130). Cette diminution du nombre de récepteurs est associée à une diminution des fonctions associées au récepteur. Par ailleurs, des expériences sur la souris ont permis de découvrir qu'une exposition au B[a]P entraîne une inhibition de la lipolyse induite par les agonistes spécifiques des R $\beta$ -AD (131). Plus récemment, les travaux de *Factor et al.* confirment les observations précédentes : ils montrent que les HAPs provoquent une diminution du taux d'ARNm, de protéines et de la réponse au R $\beta$ 2-AD (132).

Tous ces résultats correspondent à un phénomène couramment associé au RCPG : la désensibilisation du récepteur, et démontrent que le R $\beta$ 2-AD est une cible privilégiée des HAPs.

D'autre part, la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD), un hydrocarbure aromatique halogéné, diminue la réponse bêta-adrénergique et provoque une augmentation de la concentration calcique intracytoplasmique dans les cellules musculaires cardiaques de rat et dans le cœur de fœtus de poulet (133,134). En outre, la TCDD est capable d'une part d'augmenter le taux intracellulaire d'AMPc via l'activation d'une protéine G et d'autre part de moduler les voies reliant le R $\beta$ 2-AD et l'adénylate cyclase (135).

## 1. Définition

Les neuf récepteurs adrénergiques sont divisés en trois groupes,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\beta$ , qui comprennent chacun trois membres. Ils présentent tous une structure à sept hélices transmembranaires appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Ainsi, leur structure globale et leur mode d'action sont similaires. Cependant leurs effets physiologiques varient fortement de par leurs seconds messagers et leurs localisations tissulaires multiples. Ils sont présents dans l'ensemble de l'organisme, y compris le système nerveux central. Leurs ligands endogènes sont des catécholamines : l'adrénaline et la noradrénaline. Ils permettent la transduction cellulaire et tissulaire de l'activation du système sympathique. Les récepteurs  $\beta$  adrénergiques sont essentiellement des récepteurs post-synaptiques. Ils comprennent trois sous-types,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$ , codés par des gènes distincts. Un quatrième sous-type,  $\beta_4$ , correspondrait à une conformation différente du  $\beta_1$ .

Ces récepteurs sont majoritairement couplés à une protéine Gs qui active l'adénylate cyclase, avec augmentation de l'AMP cyclique intracellulaire et activation de la protéine kinase A.

Les récepteurs  $\beta_1$  prédominent dans le cœur, où leur activation stimule les fonctions cardiaques, principalement la fonction inotrope (force contractile) et la fonction chronotrope (rythme). Les antagonistes  $\beta_1$ -sélectif ( $\beta$ -bloquants) sont utilisés pour leurs propriétés cardiovasculaires. Les récepteurs  $\beta_2$  sont exprimés au niveau des cellules musculaires lisses (voies respiratoires, vaisseaux sanguins, tractus digestif et uro-génital), où leur activation se traduit par une relaxation musculaire. Les agonistes  $\beta_2$ -sélectifs sont utilisés pour leurs propriétés broncho-relaxantes et utéro-relaxantes. Les récepteurs  $\beta_3$  sont quant à eux localisés principalement sur les adipocytes, où leur activation stimule la lipolyse. Une mutation de ces récepteurs a été associée à des dysfonctionnements métaboliques, notamment l'insulino-résistance et l'obésité. Cette distribution tissulaire et fonctionnelle des divers récepteurs  $\beta$  adrénergiques est ici très simplifiée. En effet, certains récepteurs prédominent en quelques endroits mais l'ensemble des trois sous-types peut y être exprimé.

## 2. Ligands physiologiques

L'adrénaline et la noradrénaline sont sécrétées au niveau du système nerveux sympathique et par les médullosurrénales, ce qui leur octroie la qualité de neuromédiateurs et d'hormones (substances naturelles produites par un organe et qui exercent ses effets, à distance, sur d'autres organes par l'intermédiaire de récepteurs). Elles font partie, avec la dopamine, des catécholamines caractérisées par un noyau ortho-dihydroxybenzyl possédant une chaîne latérale éthyl-amine, d'où le terme de phényléthylamines. La noradrénaline est le précurseur métabolique de l'adrénaline, le neuromédiateur post-ganglionnaire sympathique et l'un des nombreux neuromédiateurs du système nerveux central.

La noradrénaline et l'adrénaline sont synthétisées dans les neurones noradrénergiques et adrénérgiques. Toutes deux sont également synthétisées par les cellules chromaffines des glandes médullosurrénales, d'où elles sont sécrétées dans la circulation sanguine pour agir en tant qu'hormone sur les organes cibles. La quantité de noradrénaline issue des médullosurrénales est moins importante que celle d'adrénaline : le rapport noradrénaline : adrénaline est d'environ 1 : 4. La biosynthèse des catécholamines (dopamine, noradrénaline et adrénaline) est assurée par une voie métabolique commune (Figure 11). Cette voie comporte aussi la L-DOPA, précurseur de la dopamine, et médicament majeur de la maladie de Parkinson, ainsi que l'enzyme-cible de médicaments aussi indiqués dans cette pathologie : la dopa-décarboxylase.

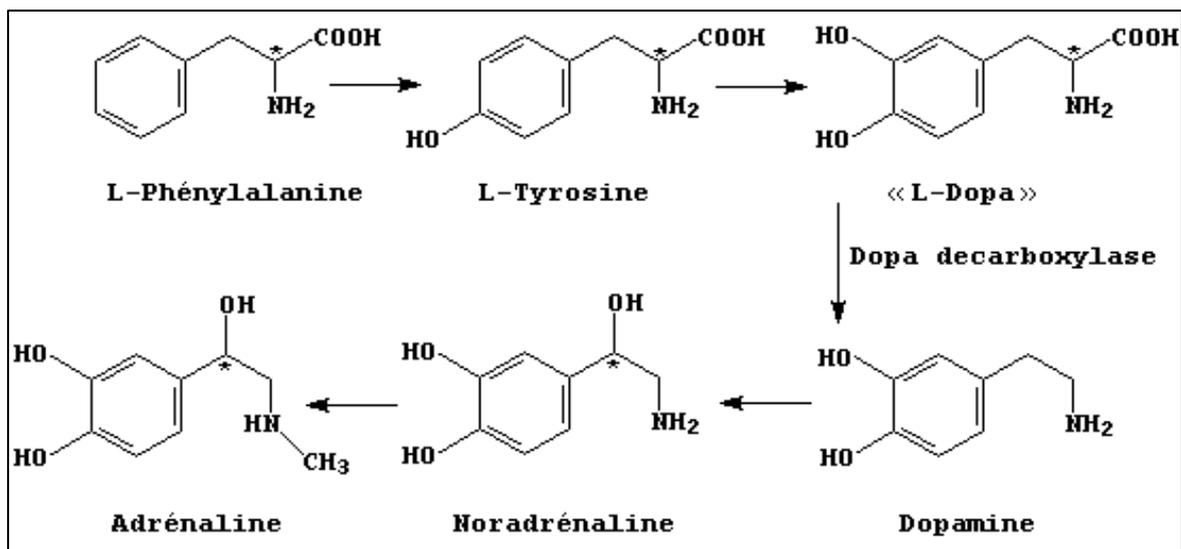


Figure 11 : Biosynthèse des catécholamines endogènes

La noradrénaline et l'adrénaline sont dégradées par l'action successive de deux enzymes : une monoamine-oxydase (MAO) et une catéchol-O-méthyl transférase (COMT). La désamination oxydative de la noradrénaline et de l'adrénaline par la MAO conduit à la formation d'aldéhydes, transformés ensuite par des réductases ou des déshydrogénases cytoplasmiques. Les métabolites produits sont excrétés vers le foie et éliminés dans les urines.

### 3. Rôles physiologiques

Le R $\beta$ 2-AD a comme ligands physiologiques les formes circulantes de l'adrénaline et de la noradrénaline. Ces hormones sont produites par les glandes médullosurrénales sous le contrôle du système nerveux sympathique et sont étroitement associées à la réaction « lutter ou fuir ». Ainsi, les agonistes de ce récepteur entraînent notamment une accélération du rythme cardiaque, une vasodilatation au niveau des muscles squelettiques, une bronchodilatation, un relâchement des muscles lisses de la paroi du tube digestif et de certains organes du système urinaire. Au niveau hépatique, la stimulation du R $\beta$ 2-AD provoque la néoglucogenèse et la glycogénolyse.

### **a. Au niveau cardiaque**

Le R $\beta$ 1-AD est prédominant dans le cœur avec un ratio  $\beta$ 1 :  $\beta$ 2-AD d'environ 70% : 30% dans les oreillettes et 80% : 20% dans les ventricules (136). En conséquence, ce sont les R $\beta$ 1-AD qui participent à la régulation de la fonction cardiaque. L'activation des R $\beta$ -AD engendre des effets inotrope (augmentation de la force de contraction), chronotrope (augmentation de la fréquence cardiaque), dromotrope (augmentation de la vitesse de conduction au niveau du faisceau de His) et bathmotrope (augmentation de l'excitabilité cardiaque) positifs. Ces effets existent en partie grâce à la voie de signalisation protéine Gs/AC/AMPC. Outre son couplage à la protéine Gs, le R $\beta$ 2-AD, à la différence du R $\beta$ 1-AD, est capable également d'activer des voies de signalisation liées à la protéine Gi, comme la voie de l'acide arachidonique et de la cPLA2, dans les cellules cardiaques (137,138). Cette divergence semble être dépendante de l'agoniste utilisé. Par exemple, dans les cellules ventriculaires isolées, le salbutamol et le terbutaline activent à la fois les protéines Gs et Gi, tandis que le fénotérol active seulement la voie de la protéine Gs (139).

### **b. Au niveau vasculaire**

Sur le plan vasculaire, contrairement au cœur, le R $\beta$ 2-AD représente le sous-type prédominant. Il est à l'origine d'une vasodilatation des cellules musculaires lisses des vaisseaux périphériques et influence ainsi la pression artérielle (140). En dehors des cellules musculaires lisses, il est prouvé que les R $\beta$ -AD sont exprimés au niveau de l'endothélium vasculaire où ils contribuent à la régulation du tonus vasomoteur via une relaxation NO-dépendante (141,142).

### **c. Dans les voies pulmonaires**

Au niveau respiratoire, le R $\beta$ 2-AD représente le sous-type prédominant des récepteurs adrénergiques, contrairement à ce qui est observé au niveau cardiaque. La densité en R $\beta$ 2-AD augmente au travers de l'arbre bronchique, avec des niveaux plus élevés dans les voies inférieures, et notamment au niveau alvéolaire. Ce récepteur est présent en quantité importante dans les cellules musculaires lisses, mais également dans de nombreux autres types cellulaires de l'appareil respiratoire et impliqués dans des phénomènes inflammatoires, tels que les mastocytes, les macrophages, les neutrophiles, les lymphocytes et les cellules épithéliales et endothéliales des poumons (143). Ces différents types cellulaires sont impliqués dans la pathogénèse de l'asthme, et semblent être la cible des agonistes  $\beta$ 2. Ces derniers sont parmi les médicaments les plus couramment prescrits dans le traitement de l'asthme. Cependant, la bronchodilatation rapide grâce à la relaxation des muscles lisses provoquée par les agonistes  $\beta$ 2 reste l'effet le plus bénéfique associé à leur utilisation.

### **d. Au niveau hépatique**

Le R $\beta$ 2-AD joue un rôle important dans la régulation des processus hépatiques impliqués dans l'homéostasie du glucose. Les ligands physiologiques, adrénaline et noradrénaline, de ce récepteur provoquent la glyco-génolyse et la néogluco-génèse, en particulier par la voie protéine Gs/AC/PKA (144–146).

### **e. Autres**

Outre les effets précédemment décrits, le R $\beta$ 2-AD est à l'origine de nombreux autres phénomènes physiologiques résumés dans le tableau suivant :

Tableau 5 : Effets physiologiques associés à l'activation du R $\beta$ 2-AD sur différents organes (147)

Organe	Effet
Muscles ciliaires (iris)	Relaxation (vision de loin)
Cœur	Augmentation du rythme cardiaque
Voies aériennes	Bronchodilatation
Glandes bronchiques	Diminution des sécrétions
Foie	Glycogénolyse, néoglucogenèse
Glandes salivaires	Sécrétion d'eau et d'amylase
Estomac	Diminution de la motilité
Intestin	Diminution de la motilité
Vésicule biliaire	Relaxation
Muscle détrusor (vessie)	Relaxation
Sphincter de l'urètre	Contraction

## 4. Voies de signalisation

### a. Les voies liées aux protéines G

La protéine G, pour « guanine nucleotide-binding proteins », est une molécule de nature protéique qui permet le transfert d'informations à l'intérieur de la cellule. Elle assure la transduction des signaux cellulaires en utilisant l'échange de GDP en GTP comme un « interrupteur moléculaire » pour déclencher ou inhiber des réactions biochimiques dans la cellule. Ainsi, lorsqu'un agoniste s'y fixe, le R $\beta$ 2-AD s'associe à une protéine G<sub>s</sub> (s pour stimulatrice). La protéine G<sub>s</sub> possède trois sous-unités : alpha ( $\alpha$ ), bêta ( $\beta$ ) et gamma ( $\gamma$ ), respectivement de masse moléculaire égale à 45, 37 et 9 kDa. A l'état inactif, la sous-unité  $\alpha$  est liée à un GDP. Lors de la formation du complexe agoniste-R $\beta$ 2-AD, la protéine G<sub>s</sub> se lie au récepteur sur la face interne de la membrane plasmique et un GTP remplace le GDP sur la sous-unité  $\alpha$ . Cela active la protéine G<sub>s</sub>, avec libération de la sous-unité  $\alpha$  du dimère  $\beta\gamma$ , conséquence de l'hydrolyse du GTP. Mais cette activation est de courte durée car la protéine G hydrolyse le GTP en GDP+Pi à une vitesse de 2 à 3 min<sup>-1</sup>, entraînant ainsi un retour à l'état

inactif. Néanmoins ce système amplifie le signal car chaque complexe ligand-récepteur active de nombreuses protéines G avant de devenir inactif et, pendant cette période, chaque complexe protéine G/GTP/adénylate cyclase catalyse la synthèse d'un grand nombre de molécules d'AMPc. La sous-unité  $G_{\alpha}$  alors fonctionnelle active l'adénylate cyclase, elle-même à l'origine de l'augmentation de la concentration intracytosolique d'AMPc. Ce second messenger principal de la voie bêta2-adrénergique, jouant le rôle de médiateur intracellulaire, active ou inhibe de nombreuses enzymes ou des cascades enzymatiques, en favorisant leur phosphorylation et leur déphosphorylation. Il permet notamment l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaires, comme l'activation des PKAs (Protéines Kinases AMPc dépendantes), une famille de canaux ioniques membranaires dits cAMP-gated channel, qui phosphorylent de nombreux substrats. En outre, l'AMPc entraîne l'activation de protéines EPAC-1 et -2 (pour Exchange Protein factor directly Activated by cAMP). La cascade de signalisation résultant de cette activation aboutit à l'augmentation de la concentration intracytosolique de calcium, par activation de la phospholipase C  $\epsilon$  (PLC $\epsilon$ ) qui hydrolyse le phosphatidyl inositol diphosphate (PIP2) membranaire en diacylglycérol (DAG) et inositol triphosphate (IP3), stimulant à son tour les récepteurs du réticulum endoplasmique, conduisant à une sortie de calcium de l'organite. L'AMPc peut également être activée par la sous-unité  $\beta\gamma$  de la protéine G. La teneur en AMPc dépend de l'activité de la phosphodiesterase 3B qui dégrade l'AMPc en 5'AMP.

Le R $\beta$ 2-AD peut également interagir de façon directe avec la protéine  $G_i$ , à l'origine de l'inhibition de l'adénylate cyclase (137,148), ou avec la protéine  $G_q$ , responsable de la stimulation de la PLC (149–151).

Au repos, c'est à dire en absence de stimulation du R $\beta$ 2-AD par un ligand, le récepteur oscille entre plusieurs conformations : une petite fraction est active alors que la conformation inactive est prédominante. Lors de l'activation par un ligand, l'équilibre est modifié pour favoriser la conformation active. Ainsi, le R $\beta$ 2-AD présente une activité basale : il y a production d'AMPc même en absence de ligand (152).

Par conséquent, on peut définir différents types de ligands pour un même récepteur (Figure 12). Un agoniste complet (full agonist) est une molécule déplaçant complètement

l'équilibre vers une conformation active du récepteur. Les agonistes partiels, quant à eux, peuvent stabiliser soit une conformation active différente du récepteur par rapport aux agonistes complets, soit la même conformation active qu'en présence d'un agoniste complet mais à une fréquence plus faible. Un agoniste inverse aura la possibilité de se lier préférentiellement au récepteur à l'état inactif en entraînant une diminution de l'activité basale du récepteur. Enfin, un antagoniste neutre est une molécule sans effet intrinsèque sur l'activité basale du récepteur mais elle bloque l'interaction des agonistes ou des agonistes inverses avec le récepteur et bloque leurs effets.

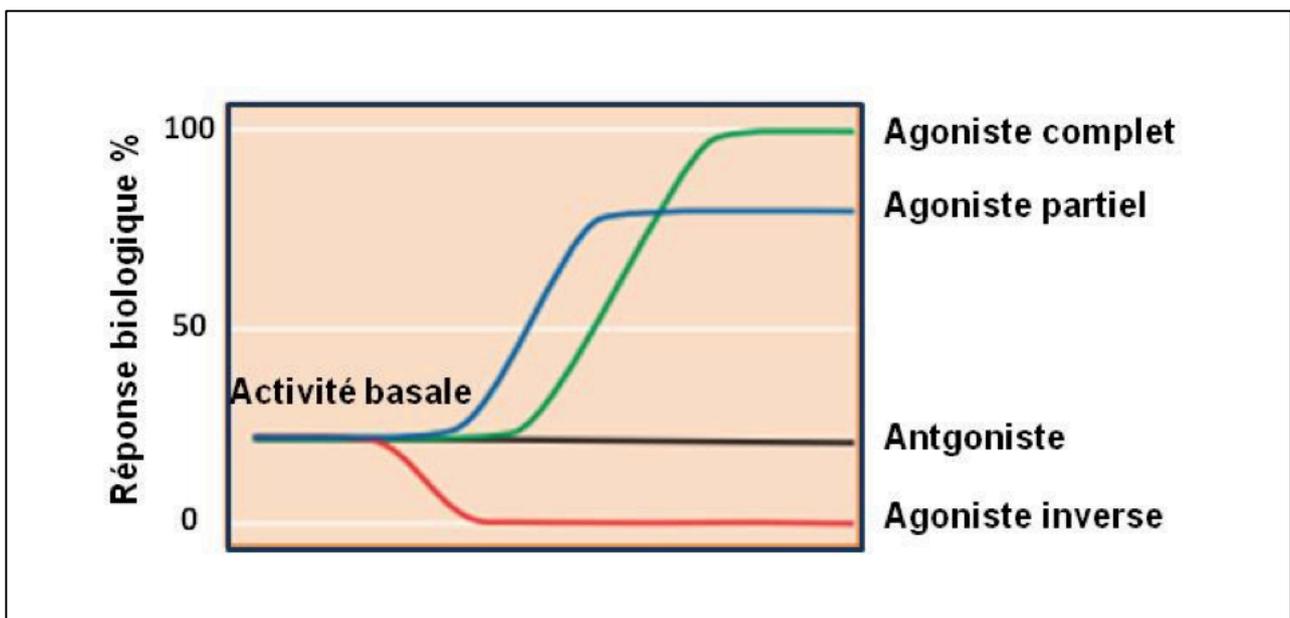


Figure 12 : Présentation des différents types de ligands

### b. Voies indépendantes de la protéine G

Auparavant, le fonctionnement des RCPG, liant les stimuli extérieurs aux réseaux de signalisation intracellulaires, était basé sur l'activation d'une protéine G. Cependant ce modèle a évolué et il est désormais prouvé que les RCPG peuvent également transmettre des signaux indépendamment de l'activation d'une protéine G (153–155). En effet, le  $\beta_2$ -AD est capable d'activer d'autres partenaires comme les protéines kinases SRC, les  $\beta$ -

arrestines ( $\beta$ -arr) ou des protéines à motif PZD (motif de type (A/A)-T-X-(L/V)). Ces activations sont notamment à l'origine de la stimulation des kinases ERKs (Extracellular signal-Regulated Kinase) ou des échanges ioniques via les échangeurs NHE1 ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Exchanger 1) (156,157).

#### i. Signalisation via les $\beta$ -arrestines

La famille des arrestines est composée de quatre membres. Les arrestines 1 et 4, spécifiquement exprimées au niveau des cônes et bâtonnets, ont la capacité de lier et inactiver les photorécepteurs. Les arrestines 2 et 3 (respectivement  $\beta$ -arr1 et  $\beta$ -arr2) sont ubiquitaires et peuvent lier et inactiver la plupart des RCPG. Ces dernières ont la capacité à limiter la signalisation via les RCPG, mais sont également des protéines d'échafaudage multifonctionnelles et impliquées dans de nombreux aspects de la signalisation dépendante des RCPG (158). En outre, elles ont la possibilité de provoquer directement des signaux intracellulaires indépendants des messagers secondaires classiques. Les  $\beta$ -arrestines permettent alors le recrutement, l'activation et l'échafaudage de complexes de signalisation cytoplasmiques, régulant ainsi la mobilité cellulaire, le chimiotactisme, l'apoptose et bien d'autres fonctions cellulaires à travers différentes voies de signalisation. Elles peuvent notamment former des complexes avec les protéines de la famille des Src tyrosine-kinases. Le complexe alors formé permet de moduler l'endocytose des RCPG, de déclencher l'activation d'ERK 1/2 et de contrôler la dégranulation des neutrophiles (159). Pour ce qui est du  $\text{R}\beta\text{2-AD}$ , l'exemple le plus étudié est la survie cellulaire par l'activation de la voie MAPK/ERK par la  $\beta$ -arr2. En utilisant la technique d'ARN interférence, des cellules KO pour la protéine G ou possédant un mutant du  $\text{R}\beta\text{2-AD}$  pour l'interaction avec la protéine G, il a été démontré que la stimulation du  $\text{R}\beta\text{2-AD}$  augmente la phosphorylation des ERKs via au moins deux voies distinctes. La première, via la protéine G, permet une activation rapide et transitoire. Tandis que la deuxième, dépendante des  $\beta$ -arr et indépendante de la protéine G, entraîne une activation plus lente mais soutenue (160). Par ailleurs, il a été montré que l'activation de la voie ERK n'est pas restreinte aux agonistes du  $\text{R}\beta\text{2-AD}$  puisque des agonistes inverses sont capables de recruter les  $\beta$ -arrestines et d'activer la voie ERK de

manière indépendante de la protéine G (161). Ainsi, on définit les ligands capables d'activer de manière différentielle une seule voie de signalisation liée aux RCPG que l'on nomme ligands à activité biaisée (Figure 13).

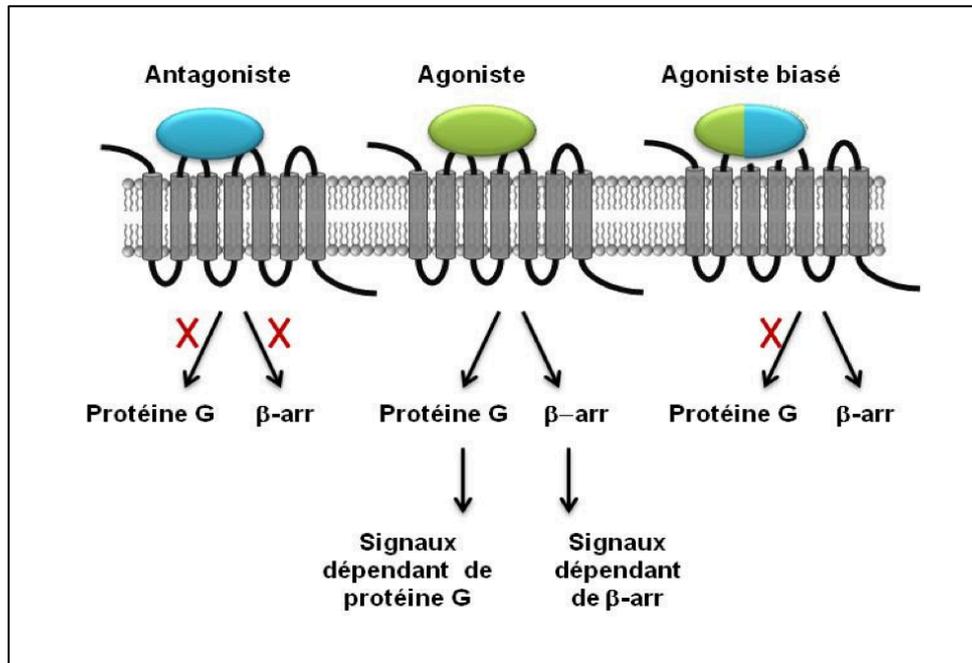


Figure 13 : Notion d'antagoniste, agoniste et agoniste biaisé

## ii. Signalisation via les tyrosines kinases SRC

La tyrosine kinase SRC est impliquée dans l'activation des protéines ERKs suite à la stimulation du R $\beta$ 2-AD. Cependant, les mécanismes moléculaires sont peu connus et semblent dépendant du type cellulaire. Ainsi, dans les cellules HEK293, l'association des  $\beta$ -arr au récepteur activé provoque le recrutement de c-SRC à l'origine de l'activation des protéines ERKs (162). Cet effet semble être déclenché par le couplage du R $\beta$ 2-AD à la protéine Gi suite à la phosphorylation du récepteur par la PKA (148). Dans les cellules MEF (Mouse Embryonic Fibroblast) ou COS-7, l'activation des protéines ERKs par le R $\beta$ 2-AD est biphasique avec un rôle essentiel de la protéine Gs pour des doses faibles d'agonistes (< 100 nM, A), et de la SRC pour des doses fortes (> 100 nM, B) (Figure 14).

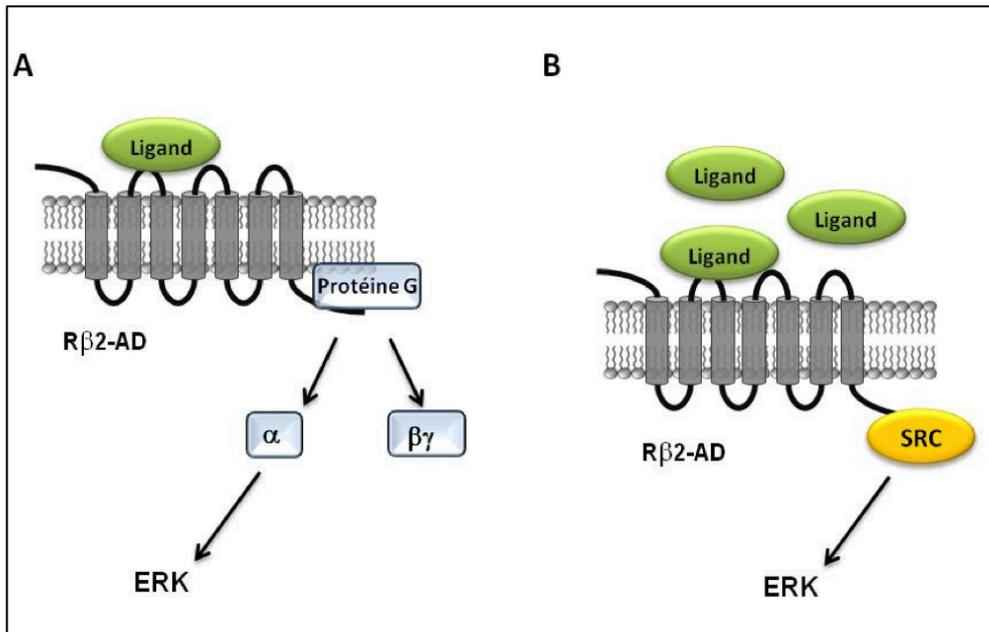


Figure 14 : Activation des ERKs lors de la stimulation d'ADRB2 dans les cellules MEF ou COS-7

### iii. Signalisation via les protéines au motif PDZ

Les protéines PDZ, nommées ainsi pour le domaine structural commun partagé par PSD95 (postsynaptic density protein), DlgA (drosophila disc large tumor suppressor) et ZO-1 (zonula occludens-1 protein), constituent une famille de 200 à 300 membres. Les protéines ayant ces motifs sont impliquées dans la signalisation cellulaire grâce à leur propriété d'échafaudage. Ces domaines servent notamment à l'ancrage des protéines transmembranaires au cytosquelette et au maintien des complexes de signalisation. Ils impactent la signalisation cellulaire par divers mécanismes. On notera en premier lieu le maintien du récepteur au niveau de la membrane cellulaire, et donc l'augmentation de la durée de liaison du ligand. A cela s'ajoute l'influence sur l'internalisation des RCPG, sur leur trafic intracellulaire et leur recyclage. Les protéines PDZ sont également capables de modifier l'assemblage des protéines accessoires telles que les β-arrestines qui régulent elles-mêmes la signalisation des RCPG. Enfin, les protéines PDZ ont la possibilité de moduler la signalisation des RCPG en altérant la protéine G avec laquelle se lie le récepteur (163). Ainsi,

comme de nombreux RCPG, le R $\beta$ 2-AD est capable d'interagir, via sa partie C-terminale, directement avec des protéines à motif PDZ telles que le NHERF1 (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger Regulatory Factor 1) (164). Cette interaction, indépendante de la protéine G, serait à l'origine de l'augmentation de l'activité de NHE (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger). En effet, le NHERF interagit avec le NHE en inhibant son activité et diminue ainsi l'échange ionique (165). Ainsi, le R $\beta$ 2-AD agit comme un compétiteur avec le NHE pour l'interaction avec le NHERF. Au repos, l'activité des NHE est inhibée par l'interaction avec le NHERF. Alors que l'activation du R $\beta$ 2-AD augmente l'activité des NHE via la compétition à la liaison avec une protéine à domaine PDZ (NHERF) (Figure 15).

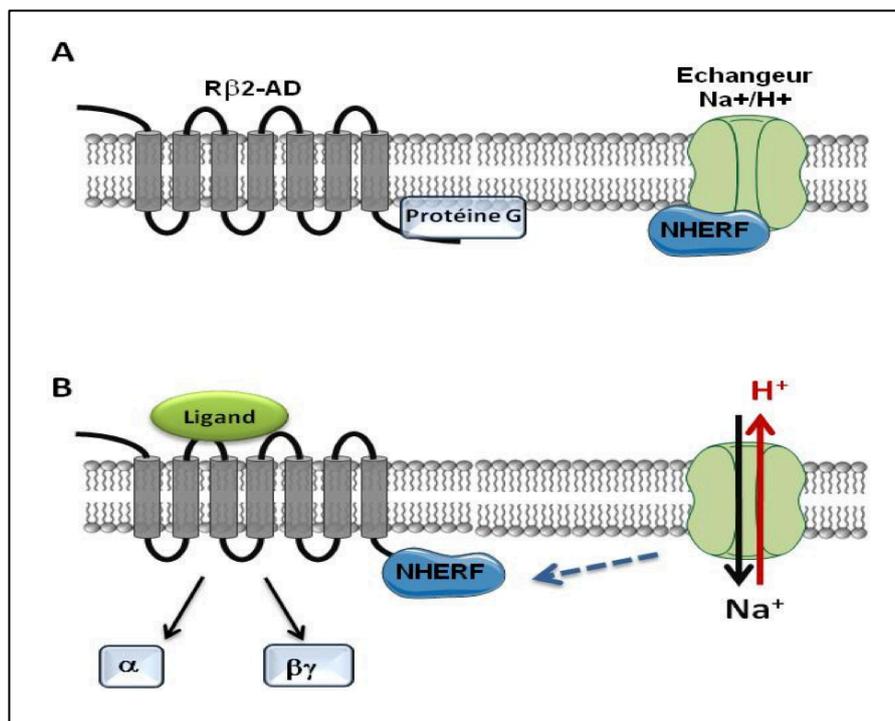


Figure 15 : Régulation de l'activité des échangeurs Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (NHE) par ADRB2

### III. Action des HAPs sur le R $\beta$ 2-AD

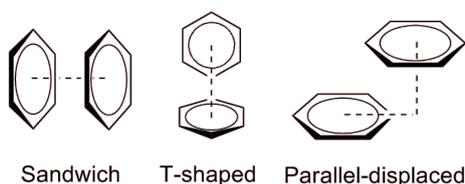
Malgré le fait que les HAPs aient une toxicité largement liée au RAh, ces molécules chimiques sont également capables d'interagir directement avec le R $\beta$ 2-AD. Cette interaction a été étudiée par *Mayati et al.* et l'ensemble de ses travaux suggère qu'elle est à l'origine d'une augmentation de la concentration calcique intracellulaire, par la mise en jeu d'une voie de signalisation impliquant successivement la protéine Gs, l'adénylate cyclase, l'AMPc, la protéine EPAC-1 et IP3 (166). Il existerait donc un lien entre le système adrénergique et les effets toxiques des HAPs. En outre, ces contaminants peuvent conduire à une perturbation des fonctions associées au R $\beta$ 2-AD en impliquant divers mécanismes : effet « like » engendrant une réponse cellulaire inadaptée, phénomène de compétition avec les ligands physiologiques, action sur les membranes, perturbation de l'expression de certains gènes et désensibilisation des récepteurs.

#### 1. Action directe sur le récepteur

Les HAPs, et plus particulièrement le B[a]P, interagissent avec le R $\beta$ 2-AD (100). Cette interaction a été confirmée par des expériences pharmacologiques de *binding*, montrant que le B[a]P est capable de se lier directement au récepteur avec un Kd d'environ 10 nM. Cette liaison est de type  $\pi$  stacking<sup>1</sup>. Le R $\beta$ 2-AD aurait un rôle dans l'augmentation de la

---

<sup>1</sup> Les liaisons  $\pi$  stacking font référence aux interactions attractives non-covalentes entre les cycles aromatiques faisant intervenir les électrons pi de ces cycles. Trois configurations géométriques sont possibles : les configurations « parallel displaced » et « T-shaped » sont plus stables que la configuration « sandwich ».



concentration calcique intracellulaire provoquée par les HAPs. En effet, des antagonistes non spécifiques tels que le carazolol et le propranolol, et un antagoniste spécifique du R $\beta$ 2-AD, l'ICI 118551, inhibent significativement l'augmentation calcique provoquée par le B[a]P. L'implication de ce récepteur a été confirmée par l'utilisation d'ARN interférent et d'un anticorps neutralisant dirigés contre le R $\beta$ 2-AD.

La liaison du B[a]P sur le R $\beta$ 2-AD est donc à l'origine de l'activation d'une voie de signalisation impliquant successivement la protéine Gs, l'adénylate cyclase, l'AMPc, la protéine EPAC-1 et l'IP3. La conséquence étant l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire, via un relargage du réticulum endoplasmique (167,168) (Figure 16).

La première étape de l'interaction du B[a]P avec le R $\beta$ 2-AD conduit donc à l'activation de l'adénylate cyclase, médiée par la protéine Gs, et entraînant ultérieurement une production d'AMPc. Lors de leurs expériences, *Mayati et al.* ont pu observer que l'utilisation d'un inhibiteur de la dissociation de la protéine G (suramine), ou de l'adénylate cyclase (2',5'-didéoxyadénosine et MDL-12,230A), diminue significativement l'augmentation calcique provoquée par le B[a]P, ce qui confirme l'implication de ces deux molécules dans la voie de signalisation issue du R $\beta$ 2-AD.

Ensuite, l'activation de l'adénylate cyclase, médiée par la fixation du HAP au R $\beta$ 2-AD est impliquée dans l'augmentation du taux intracellulaire d'AMPc. En effet, la quantité d'AMPc est rapidement augmentée après l'exposition au B[a]P. Cette induction est abolie en présence d'un  $\beta$ 2-bloquant ou d'un inhibiteur compétitif de l'adénylate cyclase. Une des cibles importantes de l'AMPc est la famille de protéines EPAC. Celles-ci jouent un rôle majeur dans la physiologie cellulaire, notamment en régulant les canaux calciques. L'augmentation de la concentration calcique intracellulaire par le biais du R $\beta$ 2-AD requière l'activation d'EPAC-1, dépendante de l'AMPc. En effet, la présence d'un inhibiteur pharmacologique et/ou de SiARN<sup>2</sup> dirigé contre EPAC-1, avec pour conséquence une

---

<sup>2</sup> Les SiARN, ou ARN interférents, sont de petits ARN pouvant se lier spécifiquement à une séquence d'ARN messenger et ainsi empêcher l'expression de gènes en clivant cet ARN.

diminution de son expression, est associée à une inhibition de l'augmentation calcique intracellulaire liée au B[a]P.

Enfin, la voie de signalisation activée par la liaison du B[a]P sur le R $\beta$ 2-AD met en jeu un messenger intracellulaire, IP3, qui permet le relargage de calcium par l'activation de son récepteur (IP3R) situé sur la membrane du réticulum endoplasmique. L'hydrocarbure augmente significativement les taux d'IP3 uniquement lorsque le R $\beta$ 2-AD est présent et fonctionnel. En effet, l'accumulation d'IP3 n'a pas lieu dans les cellules pauvres en R $\beta$ 2-AD. En outre, l'addition d'un inhibiteur du R $\beta$ 2-AD ou de l'adénylate cyclase entraîne une inhibition de cette augmentation. De même, la présence d'un inhibiteur du recyclage de l'IP3, d'un inhibiteur du récepteur à l'IP3 ou d'un inhibiteur de la sortie du calcium du réticulum endoplasmique inhibe significativement l'augmentation calcique provoquée par le B[a]P. Ce messenger provient principalement de l'action de la phospholipase C (PLC) sur le PIP2. La PLC pouvant être activée par EPAC-1, suite à une stimulation hormonale bêta-adrénergique.

Par ailleurs, ce signal calcique déclenché par la liaison du B[a]P sur le R $\beta$ 2-AD est pivot pour l'induction des gènes cibles du RAh lors de l'exposition aux HAPs. En effet, si le RAh est connu pour contrôler l'expression de gènes tels que les CYP1A1 et 1B1, il existe d'autres systèmes, dont probablement le R $\beta$ 2-AD, qui régule son activité et contrôle ainsi l'amplitude de l'induction de ses gènes cibles.

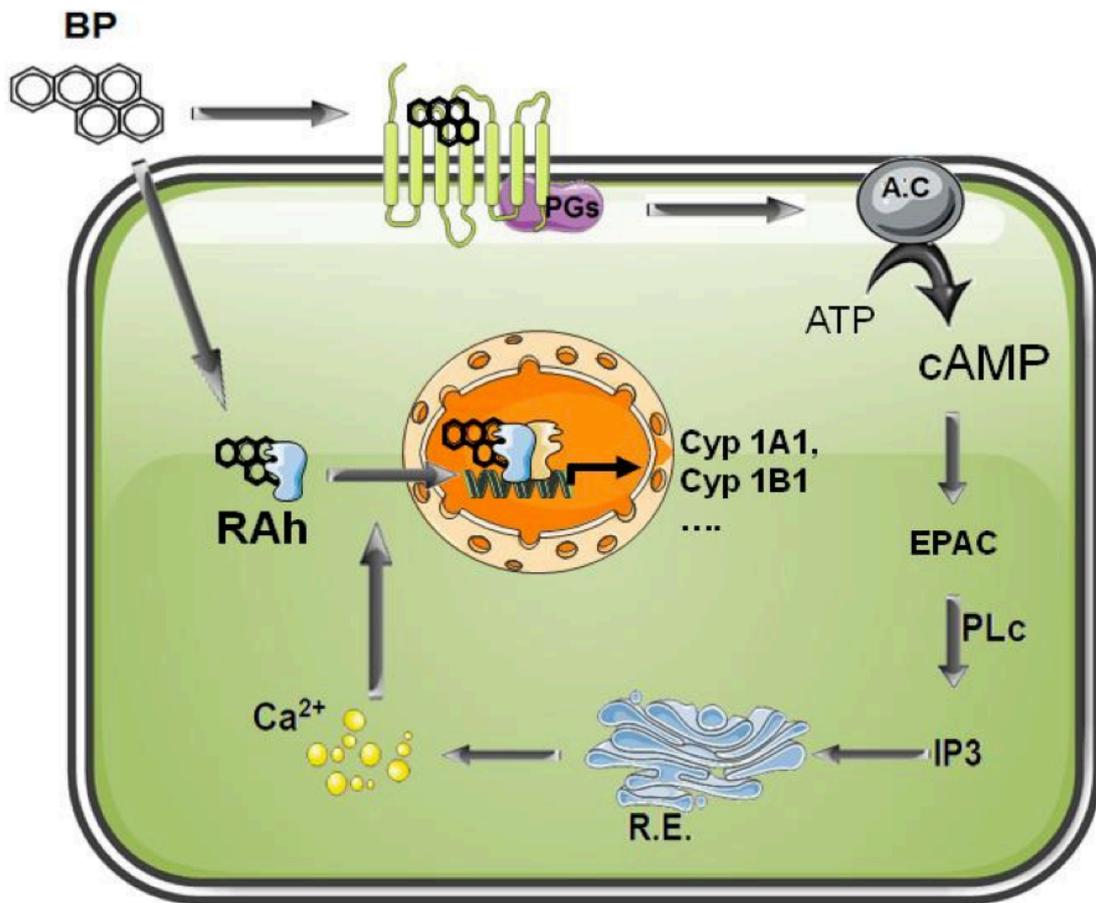


Figure 16 : Schéma récapitulatif de l'action du B[a]P sur le R $\beta$ 2-AD et le RAh

## 2. Désensibilisation du R $\beta$ 2-AD

Les R $\beta$ 2-AD sont, comme la plupart des mécanismes physiologiques, soumis à une régulation. En effet, des phénomènes de désensibilisation sont associés à leur activation. L'ampleur de la désensibilisation dépend du degré et de la durée de la stimulation par les ligands. Ainsi, ce processus d'autorégulation empêche la sur-stimulation des récepteurs. Les HAPs, en tant que ligands potentiels du R $\beta$ 2-AD, possèderaient par conséquent la propriété de désensibilisation. De cette manière, ils pourraient perturber les fonctions physiologiques du récepteur.

Trois phénomènes permettent la désensibilisation du récepteur : la dissociation du complexe R $\beta$ 2-AD/protéine Gs, l'internalisation du récepteur et la « down-regulation ».

#### **a. Dissociation du complexe R $\beta$ 2-AD/protéine Gs**

La dissociation du complexe R $\beta$ 2-AD/protéine Gs est le résultat de la phosphorylation du R $\beta$ 2-AD. Cette phosphorylation se fait sur les résidus sérine et thréonine situés au niveau de la troisième boucle intracellulaire et dans la partie C-terminale du récepteur. Elle est opérée par des sérine-thréonine kinases, notamment les PKA, PKC et GRKs (G protein-coupled receptor kinase) (169–172). La famille des GRKs comprend sept isoformes, classées en trois sous-familles selon leur séquence et leur homologie de structure. Les sous-familles 1 et 7, celles des kinases de rhodopsine, sont présentes de façon quasi-exclusive dans les cônes et les bâtonnets. Les autres sous-familles sont relativement ubiquitaires. Alors que les sous-familles 2 et 3 regroupant les ARKs (adrenergic receptor kinase), sont recrutées au niveau membranaire en fonction de l'interaction avec les sous-unités  $\beta\gamma$ , les sous-familles 4, 5 et 6 sont constitutivement associées à la membrane cellulaire. L'activité de ces protéines est régulée par divers mécanismes distincts : une régulation de la localisation des GRKs et/ou de leur activité kinase par différentes protéines et une régulation de leur niveau d'expression (173). Toutes ces GRKs ont une action spécifique sur les récepteurs dans leur état actif, avec pour conséquence une phosphorylation homologue (174). En revanche, la phosphorylation via les PKA est considérée comme hétérologue, c'est-à-dire que l'enzyme phosphoryle toutes les conformations, actives et non actives, du récepteur. La conséquence est la désensibilisation de certains récepteurs non liés à leurs ligands (172).

La phosphorylation du R $\beta$ 2-AD permet de réguler la fonction du récepteur. Elle correspond à la phase aiguë et transitoire de la désensibilisation. En effet, elle ne commence que quelques secondes à quelques minutes après l'activation du récepteur et est réversible quelques minutes après le découplage de l'agoniste. Plusieurs mécanismes coexistent. Tout d'abord, on notera une augmentation de l'affinité du récepteur aux  $\beta$ -arrestines. Ces protéines d'échafaudage permettent l'accrochage d'autres protéines, dont PDE4, dans le

microenvironnement du récepteur. L'AMPc est alors métabolisé par PDE4, ce qui provoque une limitation dans la propagation du signal cellulaire (175). Un deuxième mécanisme, couramment appelé « shift Gs-Gi », entraîne la dissociation du récepteur de la protéine Gs et augmente son affinité pour la protéine Gi. L'adénylate cyclase est alors inhibée par Gi et la réponse aux stimulations par les ligands est limitée (176).

### **b. Internalisation du récepteur**

Lors d'une activation plus prolongée, le récepteur préalablement dissocié de la protéine Gs sera internalisé. Par conséquent, une perte de densité en récepteurs s'observera à la surface cellulaire. La voie majeure d'internalisation est la voie dépendante des clathrines, aboutissant à la formation de structures spécialisées, les « clathrin coated pits » (CCP). Ces cages à clathrine représentent l'un des principaux mécanismes d'endocytose associés à l'internalisation des récepteurs et à la phagocytose des bactéries. Plusieurs acteurs interviennent dans le phénomène d'internalisation du R $\beta$ 2-AD : les GRKs (177), les  $\beta$ -arrestines (178) et les clathrines (179). Dans un premier temps, il y a phosphorylation par les GRKs des résidus sérines (354, 355 et 365) dans la queue cytoplasmique du R $\beta$ 2-AD. Cela va favoriser l'interaction du récepteur avec les  $\beta$ -arrestines. Il s'en suit un découplage du récepteur de la protéine Gs. Les  $\beta$ -arrestines, molécules indispensables pour la formation du complexe protéique, interagissent avec deux composants structurels du CCP, favorisant ainsi l'endocytose du récepteur : les molécules de clathrines (179) et l'AP-2 (adaptor protein 2). AP-2, une molécule adaptatrice composée de quatre sous-unités, va reconnaître spécifiquement la partie cytoplasmique des récepteurs à endocyter. Il a été démontré que cet adaptateur module l'internalisation de beaucoup de protéines membranaires, dont les RCPG (180). Le R $\beta$ 2-AD forme un complexe protéique avec les GRKs, les  $\beta$ -arrestines et les clathrines dans les CCP durant les premières étapes d'internalisation. Cependant, le rôle des  $\beta$ -arrestines se termine au moment de la formation des vésicules. Elles ne s'internalisent pas avec le récepteur. Ce découplage des  $\beta$ -arrestines du R $\beta$ 2-AD facilite la déphosphorylation du récepteur par les enzymes de la famille des phosphatases (GRP, G-protein coupled receptor phosphatase) (178,181). Le récepteur peut ensuite être recyclé, une étape encore

appelée resensibilisation, conduisant au ré-adressage du récepteur vers la membrane pour un nouveau cycle d'activation (182,183). Ainsi, l'internalisation pourrait jouer un rôle dans la régulation à court terme des RCPG. Initialement, l'internalisation a été perçue comme un phénomène participant à la désensibilisation. Puis, comme elle entraîne le recyclage du récepteur, elle a été reconnue comme un facteur limitant la désensibilisation. Mais ce n'est pas aussi simple que cela, car il a été montré que certains RCPG ne sont pas recyclés à partir des endosomes mais dirigés vers la dégradation (184). Quant au R $\beta$ 2-AD, la quasi-totalité des récepteurs internalisés seront recyclés à la surface au bout de quelques minutes après l'arrêt de la stimulation (185). La resensibilisation de ces récepteurs requière leur déphosphorylation. Cela est étroitement régulé par le pH de la vésicule endosomale. En effet, le ré-adressage du récepteur à la surface cellulaire nécessite une conformation spécifique, provoquée par l'acidification de la vésicule. Le simple fait de bloquer cette acidification bloque l'association de la phosphatase au récepteur, et donc sa déphosphorylation (186).

### **c. La « down-regulation »**

Lors d'une exposition chronique du récepteur à ses agonistes, le nombre total de R $\beta$ 2-AD à la surface cellulaire diminue. Deux principaux mécanismes sont alors mis en cause : d'une part la dégradation des ARNm codant pour le R $\beta$ 2-AD, et d'autre part la dégradation du récepteur lui-même.

La stimulation prolongée du R $\beta$ 2-AD par un agoniste engendre une « down-regulation » qui est étroitement associée à une réduction du taux d'ARNm correspondant. Cette dégradation est en partie provoquée par des modifications de la stabilité des ARNm et fait intervenir une séquence d'environ vingt nucléotides riche en adénosine et uridine (ou ARE, A/U rich element), située dans la région 3'-non codante de l'ARNm (3'UTR ou 3' untranslated region) (187). Les protéines AUF1 (A/U rich mRNA-binding/degradation factor) et  $\beta$ -ARB (beta2-adrenergic receptor mRNA-binding protein) peuvent se lier à la partie 3'UTR et conduire à la diminution de la stabilité des ARNm (188–190). Ce processus est AMPc-

dépendant (187,191). La substitution du motif ARE par des résidus cytosine entraîne l'annulation de la « down regulation » de l'ARNm et inhibe la formation du complexe ARN-protéine (189). Pour résumer, la déstabilisation de l'ARNm du R $\beta$ 2-AD induit par l'agoniste est régulée par la liaison AMPc-dépendante d'une protéine sur l'ARNm via les séquences ARE. *Pende et al.* ont démontré que dans le cœur humain, l'ARNm codant pour la protéine AUF1, ainsi que la protéine elle-même, sont significativement augmentés chez les individus ayant un infarctus du myocarde, lui-même corrélé à une augmentation du taux de norépinephrine (190). L'exposition chronique aux agonistes du R $\beta$ 2-AD entraîne donc une dégradation de ses ARNm ; alors qu'une exposition à court terme (inférieure à une heure) provoque une induction de nature transcriptionnelle, dépendante de l'AMPc (191,192). Même si le mécanisme et l'objectif de cette induction sont mal compris, on considère qu'elle pourrait correspondre à l'auto-préparation de la cellule pour compenser la perte du récepteur à la surface cellulaire suite à son internalisation et sa dégradation lors d'une stimulation aigue.

La diminution du nombre de R $\beta$ 2-AD fait également intervenir la dégradation du récepteur lui-même. Après internalisation dans les endosomes, le récepteur est rapidement recyclé au niveau membranaire, ce qui permet la resensibilisation du signal (193). Cependant, lors d'une stimulation chronique, les endosomes fusionnent avec les lysosomes. Le récepteur serait alors ubiquitinylé afin d'être dégradé (194,195). Cette ubiquitination du R $\beta$ 2-AD est un phénomène réversible, contribuant ainsi à la protection du récepteur de la dégradation dans les lysosomes et à son ré-adressage à la membrane cellulaire (196). Ainsi, ce processus est un moyen pour ajuster le nombre de récepteurs à la surface cellulaire et qui influence directement l'intensité de la réponse physiologique aux agonistes  $\beta$ 2-adrénergiques.

#### **d. Action des HAPs en faveur d'une désensibilisation du R $\beta$ 2-AD**

Plusieurs interactions ont été décrites entre les HAPs et les voies de signalisations liées au R $\beta$ 2-AD. La mise en évidence d'un phénomène de désensibilisation permet de justifier cette interaction.

Il a été montré que la fumée de cigarette, connue pour contenir de nombreux HAPs, entraîne une baisse du nombre de R $\beta$ -AD à la surface des cardiomyocytes et une diminution de la densité des R $\beta$ -AD, plus particulièrement des R $\beta$ 2-AD, à la surface des cellules mononucléées sanguines aussi bien chez l'Homme que chez l'animal (128–130). Par ailleurs, la lipolyse induite par l'adrénaline dans les adipocytes humains, et dépendante des R $\beta$ -AD, est inhibée par le B[a]P de façon dose-dépendante (131). Ainsi, une exposition chronique aux HAPs pourrait avoir un impact sur les désordres métaboliques, comme l'obésité. De même, l'exposition chronique à un mélange de HAPs diminue le nombre et l'activité des R $\beta$ 2-AD dans les cellules musculaires lisses des voies respiratoires et les cellules épithéliales alvéolaires murines. En effet, d'après *Factor et al.* il existe un lien entre l'exposition aux HAPs et les symptômes de l'asthme chez le jeune enfant. Pour vérifier son hypothèse, il a exposé des cellules humaines et de souris à des concentrations variées d'un mélange de HAPs. En focalisant son étude sur les cellules musculaires lisses pulmonaires humaines et les cellules épithéliales de trachée murine, il a observé une forte réduction des R $\beta$ 2-AD au niveau protéique ainsi qu'au niveau des ARNm (132).

Sachant que les hydrocarbures, comme le B[a]P, peuvent interagir avec le R $\beta$ 2-AD et qu'ils possèdent un certain niveau d'activation de ces récepteurs, l'ensemble de ces phénomènes observés après une exposition à ces contaminants de l'environnement peut être considéré comme un marqueur de désensibilisation, ce qui constitue un argument supplémentaire démontrant l'existence d'une interaction ligand-récepteur possible.

# **PARTIE IV**

## **CONCLUSIONS**

# I. Discussion générale

Notre environnement possède toutes les ressources nécessaires à la vie. Mais il nous expose également à de nombreux contaminants pouvant mettre notre survie en péril. Ces contaminants sont ubiquitaires, présents aussi bien dans l'air que nous respirons, que dans l'eau ou les aliments. Leur existence naturelle dans les milieux, comme c'est le cas pour les métaux lourds, les parasites, les substances radioactives ou encore les hydrocarbures, est augmentée par les activités humaines. Malgré leur grande disparité géographique, les contaminants environnementaux peuvent avoir des conséquences sur tous les organismes vivants. En effets, ils possèdent de très nombreux effets toxiques, avec une action à plus ou moins long terme. Pour cela, ils peuvent cibler des récepteurs, véritables intermédiaires dans la transmission des informations à l'intérieur des cellules. Parmi ces récepteurs, on trouve les RCPG. Ils forment une superfamille d'environ 360 récepteurs présents dans tous les tissus de l'organisme. Ce sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G. Les principales fonctions de l'organisme, dont la réponse cellulaire aux hormones et aux neurotransmetteurs, sont contrôlées par ces récepteurs. Ce qui fait d'eux des cibles privilégiées à la fois pour les médicaments et les contaminants.

Parmi les contaminants de l'environnement ayant des effets toxiques chez l'Homme, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) sont très étudiés. En effet, du fait de leur omniprésence dans l'environnement sous forme de mélange, ainsi que leurs effets délétères au niveau de l'organisme, ils représentent un risque en terme de santé publique. Leur distribution ubiquitaire est liée à la diversité des sources de production. Dans la nature, les rejets sont principalement liés aux feux de forêts et aux éruptions volcaniques ; alors que les sources anthropiques sont plus nombreuses : industries, combustion de matière organique provenant de carburant utilisé pour les transports ou le chauffage ou du mode de cuisson et à la fumée de cigarette<sup>3</sup>. Le benzo[a]pyrène est présent de façon quasi-

---

<sup>3</sup> HAPs contenus dans la fumée de cigarette : B[a]P, benzo[a]anthracène, benzo[b]fluoranthène, benzo[j]fluoranthène, benzo[k]fluoranthène, dibenz[a,h]anthracène, dibenzo[a,l]pyrène, dibenzo[a,c]pyrène, 5-méthylchrysène, indéno[1,2,3-c,d]pyrène

systematique dans les mélanges de HAPs auxquels l'Homme est exposé, ce qui fait de lui le HAP de référence. Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) le classe d'ailleurs comme cancérogène pour l'Homme (classe 1). Il est reconnu que ces composés jouent un rôle important dans l'apparition ou l'aggravation de nombreuses pathologies humaines graves, tels que les cancers et les maladies des systèmes cardiovasculaire et immunitaire. Les effets toxiques des HAPs sont médiés par différentes voies, notamment celle liée au RAh. En outre, on sait désormais que ces molécules d'hydrocarbures ciblent les RCPG, comme la plupart des contaminants environnementaux. Actuellement, c'est principalement la liaison au R $\beta$ 2-AD qui est étudiée. Les travaux de *Mayati et al.* mettent en avant une interaction directe entre le B[a]P et le R $\beta$ 2-AD (166). En effet, les analyses de modélisation cellulaire *in silico* suggèrent des contacts importants entre le B[a]P avec les différents acides aminés aromatiques du R $\beta$ 2-AD. Le site de liaison se situerait probablement entre les segments transmembranaires TM3, TM5 et TM6 du récepteur et, au vu de la structure aromatique du B[a]P, la liaison serait de type  $\pi$  stacking. L'affinité du B[a]P est parmi les plus importantes relevées pour les ligands du R $\beta$ 2-AD ( $K_d = 10$  nM). Cela est en concordance avec les concentrations en HAPs auxquels l'Homme est régulièrement exposé. Bien que ces travaux doivent être complétés par des études pharmacologiques plus poussées, il semble que le B[a]P puisse être considéré comme un agoniste du R $\beta$ 2-AD. Il possède donc la capacité de perturber la signalisation physiologique de ce récepteur, et probablement des autres R $\beta$ -AD. En effet, le B[a]P est également capable de perturber l'expression et/ou l'activité du R $\beta$ 1-AD et du R $\beta$ 3-AD (129–131).

Pour être un agoniste, une molécule doit se lier de manière spécifique à un récepteur et provoquer les mêmes effets que le ligand physiologique. Pour le R $\beta$ 2-AD, il s'agit de l'épinéphrine. Si la fixation du B[a]P au R $\beta$ 2-AD entraîne une augmentation de la concentration calcique intracellulaire, de la même façon que l'épinéphrine, l'induction du taux d'AMPc intracellulaire par ce contaminant de l'environnement est quant à elle plus lente et moins importante. Il semble donc que le B[a]P ne corresponde pas à la définition classique de l'agoniste. Cette observation est confirmée par l'effet du B[a]P sur l'expression des gènes dépendants du R $\beta$ 2-AD. Ainsi, les gènes de la famille NR4A, alors qu'ils sont facilement induits par l'adrénaline ou le salbutamol (agoniste spécifique du R $\beta$ 2-AD), le sont

difficilement par le B[a]P (données non publiées, laboratoire IRSET, Université de Rennes 1, *Eric Le Ferrec et al.*). Il semble donc que le B[a]P soit un mauvais agoniste.

Si le B[a]P apparaît comme un mauvais agoniste, il reste cependant évident qu'il possède la capacité de désensibiliser de manière efficace le R $\beta$ 2-AD. La littérature démontre que la fixation de l'hydrocarbure sur les R $\beta$ 2-AD provoque une diminution de leur nombre à la surface cellulaire. En effet, l'exposition à la fumée de cigarette diminue le nombre de R $\beta$ 2-AD à la surface des lymphocytes humains (129,130) et des cellules cardiaques de rat (128). De même, le B[a]P peut atténuer la signalisation associée aux R $\beta$ -AD dans les adipocytes, défavorisant ainsi la lipolyse (131). En outre, les expériences de *Factor et al.* ont permis d'appuyer l'hypothèse de cette désensibilisation. Lors de ses travaux, il a été démontré que l'exposition chronique des cellules musculaires lisses pulmonaires aux mélanges de HAPs entraîne une forte réduction des R $\beta$ 2-AD au niveau protéique ainsi qu'au niveau des ARNm (132). Les HAPs peuvent donc entraver la relaxation des voies respiratoires médiée par la voie  $\beta$ 2-AD. Ainsi, une cellule, un organe ou l'organisme tout entier est incapable de répondre correctement à la stimulation physiologique provoquée par les ligands du R $\beta$ 2-AD, lors d'une exposition chronique aux HAPs. L'homéostasie est alors dérégulée.

Suite à ces observations, on peut supposer que l'exposition chronique aux HAPs peut jouer un rôle non négligeable dans la vitesse de survenue de certaines maladies chroniques, en particulier cardiovasculaires et pulmonaires (24). Les R $\beta$ 2-AD, qui sont présents au niveau des parois des coronaires (197), permettent d'adapter la vasodilatation et de réguler ainsi la perfusion cardiaque. Dans le cas d'un patient présentant a priori une faiblesse cardiaque, la désensibilisation des R $\beta$ 2-AD due aux HAPs pourrait empêcher la vasodilatation des coronaires et par conséquent engendrer des problèmes cardiaques potentiellement graves comme l'infarctus du myocarde. De la même façon, l'implication de ce récepteur et des HAPs dans l'apparition du syndrome métabolique n'est actuellement pas démontrée mais il serait cependant légitime de se poser la question. En effet, le R $\beta$ 2-AD joue un rôle dans l'équilibre glycémique par action sur la glycogénolyse musculaire, la néoglucogenèse hépatique et la sécrétion d'insuline par les îlots de Langerhans du pancréas (144–146). Il intervient également dans le métabolisme des lipides.

Les HAPs, en se fixant sur le R $\beta$ 2-AD, entrent indirectement en compétition avec ses ligands physiologiques, tels que l'adrénaline et la noradrénaline. En effet, lorsque deux composés sont susceptibles d'interagir avec la même cible, on observe un phénomène de compétition. L'interaction des substances sera influencée par divers paramètres contrôlant cette compétition (qui contrôlent la liaison), dont la concentration des deux substances et leur affinité respective pour la cible. Ce phénomène peut entraîner une perturbation des fonctions physiologiques.

Au niveau des microdomaines de la membrane plasmique, les HAPs engendrent une modification de la composition en cholestérol et en acides gras. Le remodelage membranaire alors induit régule l'alcalinisation intracellulaire, étape préalable au phénomène d'apoptose cellulaire. En outre, la formation d'ERO entraîne une oxydation des lipides membranaires, également appelée peroxydation lipidique, pouvant altérer la fonctionnalité des membranes, et notamment des récepteurs qui y sont ancrés. A terme, le fonctionnement de certains organes peut être modifié. Par ailleurs, l'action des HAPs sur les membranes conduit à des changements conformationnels de la bicouche de phospholipides, en particulier dans les environs des récepteurs. Cela peut notamment se traduire par une modification de la fluidité membranaire, caractéristique conditionnant le bon fonctionnement du R $\beta$ 2-AD, et des RCPG en général. Il est probable que les perturbations portent atteinte à la partie transmembranaire des récepteurs, modifiant ainsi leur activité.

Etant donné le nombre de RCPG et leur rôle fondamental dans la physiologie humaine et dans la réponse thérapeutique aux médicaments (environ 40% des médicaments ciblent les RCPG), et au vu de l'exposition importante aux HAPs, on peut craindre que la réponse pharmacologique attendue des médicaments soit modifiée. Actuellement aucune étude n'a abordé cette problématique mais on peut facilement imaginer qu'un médicament ciblant le R $\beta$ 2-AD ait une action différente de celle attendue au vu des résultats présentés précédemment. D'après les résultats de *Factor et al.*, les HAPs environnementaux peuvent ralentir la dilatation des voies respiratoires médiée par le R $\beta$ 2-AD. Ainsi, les polluants atmosphériques ne contribuent pas seulement à la pathogénicité de l'asthme, ils diminuent également la réponse thérapeutique aux médicaments. Une attention particulière devra donc être portée à l'exposition aux HAPs par la fumée de cigarette ou la pollution chez les

patients asthmatiques traités par des agonistes  $\beta$ 2-adrénergiques, tel que le salbutamol (Ventoline®).

Une relation étroite entre les RCPG et les contaminants de l'environnement existe. En effet, de plus en plus de travaux démontrent que les contaminants environnementaux auxquels l'Homme est perpétuellement exposé interagissent directement ou indirectement avec les RCPG. Ainsi, les phtalates, le bisphénol A et les nonylphénols, issus de l'industrie du plastique, ont tous été associés à la perturbation de voies dépendantes des RCPG, en particulier dopaminergique (198,199). Cela démontre que l'aspect « perturbateur endocrinien » associé à ces molécules ne se solde pas uniquement par l'interaction avec les récepteurs aux hormones sexuelles.

Par ailleurs, le travail effectué ici ne s'intéresse qu'à l'étude d'une classe de RCPG et d'une classe de contaminants. Or il existe une multitude de classes de RCPG et de contaminants. Il est donc probable que chaque contaminant ait sa propre cible, différente du  $R\beta$ 2-AD. Il serait alors intéressant d'étudier la place des autres RCPG dans les effets toxiques d'autres contaminants environnementaux.

## II. Education thérapeutique

L'objectif majeur est de diminuer l'exposition aux contaminants environnementaux tels que les HAPs, mais également de diminuer leur émission à plus long terme. Si ces contaminants sont ubiquitaires, l'Homme n'est cependant pas exposé à des quantités identiques selon le lieu, l'activité et le mode de vie. Les conseils que l'on pourra donner pour diminuer l'exposition sont liés au bon sens et au raisonnable. Il est évident que l'élimination des sources de contamination quelles qu'elles soient et l'usage des produits les moins toxiques pour l'Homme et l'environnement sont les premières mesures à mettre en place, et ce dans tous les domaines : domestiques (nettoyage, bricolage, chauffage, ...) et professionnels. Cependant, il est illusoire de croire que l'on peut éliminer tous risques d'exposition car ils sont directement liés à nos activités. Par contre, on peut proposer quelques solutions simples pour faire évoluer nos habitudes, individuelles ou collectives, dans l'objectif de réduire les risques. D'une manière générale, il faut être particulièrement vigilant avec les personnes fragiles, tels que les enfants, les femmes enceintes, les personnes âgées, et souffrant de maladies chroniques. En effet, ils sont physiologiquement plus vulnérables et les conséquences d'une exposition aux contaminants peuvent se révéler plus délétères. Par exemple, une exposition aux HAPs chez la femme enceinte peut entraîner des malformations congénitales ou perturber le déroulement de la grossesse et le développement du fœtus en franchissant la barrière placentaire (200,201).

Comme une des voies majeures d'exposition aux contaminants de l'environnement, y compris aux HAPs, est l'air que nous respirons, quelques règles simples sont à respecter. Il est primordial, d'une part de veiller à aérer correctement les pièces de la maison tous les jours, et plus particulièrement pendant et après les activités domestiques nécessitant l'utilisation de produits chimiques (nettoyage, bricolage, ...), et d'autre part de ne pas obstruer les bouches de ventilation dans les habitations. Lors de la manipulation de ces produits, il est conseillé, de plus, de porter des protections adaptées (masque, gants, lunettes) pour éviter un contact direct avec les tissus et/ou une inhalation.

Pour limiter les risques liés à la manipulation des produits chimiques, tels que les produits de nettoyage, désodorisants et désinfectants, il convient de respecter les précautions et modes d'emploi, notamment l'interdiction de les mélanger. Seuls les produits indispensables doivent être utilisés, et à des quantités adaptées. Le stockage de ces produits doit se faire hors de portée des enfants et dans un endroit aéré de préférence (respecter les conditions de stockage propres à chaque produit). Le choix du produit doit se faire en fonction de l'usage (exemple : pas d'utilisation en intérieur d'un produit prévu pour l'extérieur). Dans la mesure du possible il faut éviter d'utiliser des produits aérosol ou des sprays contenant des substances nocives, des parfums d'ambiance, bougies parfumées ou encore bâtons d'encens, ... D'autres actions simples peuvent également être mises en œuvre. Par exemple, il est conseillé de sortir les plantes d'intérieur à l'extérieur lors de leur traitement. Cela évitera que les pesticides ne se répandent dans l'air intérieur. S'il est impossible de les sortir alors il faut ouvrir les fenêtres pendant le traitement et les heures qui suivent.

Pendant les travaux de bricolage, l'exposition aux produits toxiques est très fréquente, notamment par l'utilisation de peintures, colles, solvants, vernis, diluants, ... Dans ce cas il faut sortir régulièrement de la pièce pour faire des pauses. Si possible, travailler à l'extérieur. Les récipients doivent être refermés pour éviter qu'ils ne s'évaporent. Il faut proscrire le lavage des mains à l'essence (térébenthine ou carburant), l'utilisation de chiffons imbibés dans les garages, le nettoyage d'outils au gazole, le dégraissage manuel à l'essence de pièces mécaniques, ... Par ailleurs, l'utilisation des petits engins à moteur (tronçonneuses, ...) est déconseillée dans des endroits non ventilés.

En dehors des activités domestiques, les comportements et habitudes humaines sont la principale source d'exposition aux contaminants de l'environnement. Ainsi, la cigarette est la principale source d'exposition aux HAPs chez les fumeurs. La fumée de cigarette contient une multitude de composés toxiques pour l'Homme, comme les HAPs, dont certains sont cancérogènes (B[a]P). Il est évident que l'arrêt de l'usage de la cigarette est la première mesure à mettre en place en terme de prévention. Si cette option n'est pas envisageable, il faut savoir que si l'on fume à l'intérieur, le fait d'ouvrir les fenêtres n'est pas suffisant car les composants de la fumée restent dans l'air ambiant et qu'une partie est adsorbée à la surface

des rideaux, tissus et moquettes. Ils continuent donc à être relargués à partir de ces surfaces dans l'air intérieur. Ne pas fumer à l'intérieur de lieux clos et se placer à l'extérieur pour fumer est donc une solution. Il est également recommandé de respecter les zones fumeurs/non fumeurs car le tabagisme passif exposerait également aux effets toxiques liés aux HAPs.

L'autre voie de contamination par les HAPs est l'alimentation. En effet, les particules émises dans l'atmosphère, riches en HAPs, peuvent se déposer sur les fruits et les légumes au niveau des zones de culture. Il est donc impératif de bien les laver avant de les consommer. En outre, le mode de cuisson des aliments est également source de HAPs, comme le fumage et la cuisson à haute température (grillade, barbecue). La consommation de ce type de produits doit être limitée. En effet, la toxicité est corrélée à la quantité et à la fréquence de consommation de ce type d'aliments. Il ne s'agit donc pas de la stopper complètement mais de la réduire. De manière plus générale, l'alimentation est une source d'exposition majeure à de nombreux composés chimiques (conservateurs, édulcorants, ...). Il est donc préférable de consommer des aliments peu ou non transformés (exemple : achat directement chez le producteur). Si notre alimentation est une source majeure d'exposition à des contaminants, elle est aussi une source de molécules ayant des actions bénéfiques sur la santé. Ainsi, les fruits et les légumes sont connus pour permettre à l'organisme d'acquérir des moyens de lutte contre certains effets toxiques des contaminants, comme les antioxydants.

Une autre façon d'être exposé aux contaminants par la voie respiratoire est la pratique d'une activité physique en extérieur. Bien qu'une pratique sportive soit unanimement recommandée pour la santé, il est déconseillé de le faire dans un environnement pollué (202). En effet, lors d'un effort physique la fréquence respiratoire est augmentée. La quantité de contaminants inhalés est donc logiquement plus importante. Il est donc plus prudent de pratiquer une activité, tels que le vélo ou le footing, en campagne plutôt qu'en pleine zone urbaine. Autrement, la pratiquer loin des grandes artères, préférer les parcs et les zones bien ventilées. A minima, le port d'un masque filtrant (Figure 17) peut également être suggéré dans les zones où des pics importants de pollution sont atteints. Les

plus performants peuvent empêcher la plupart des particules fines (jusqu'à PM 0,6) d'atteindre les poumons.



*Figure 17* : Exemple de masque pouvant être utilisé pour la pratique du sport

Nous venons d'aborder principalement des situations d'exposition domestique. Néanmoins, le cadre professionnel doit être pris en compte lorsque l'on parle d'exposition aux contaminants de l'environnement. Dans le cas des HAPs, il existe des professions qui exposent à un risque élevé de contact avec ces molécules toxiques. Dans ce cas, elles pénètrent dans l'organisme majoritairement par les voies respiratoire et transcutanée. Il est donc nécessaire de mettre en place des moyens de prévention et d'information des personnels concernés pour éviter au maximum les effets délétères sur la santé. Le cas des professionnels de la voirie est représentatif de la situation. En effet, l'exposition concomitante aux fumées de bitume ou de goudron et aux ultraviolets solaires, peuvent être à l'origine de lésions cutanées, tel que le cancer. Dans ce cas, la prévention la plus efficace est d'isoler le personnel de la source d'hydrocarbures.

NOM et Prénom : DESECHALLIERS Thomas

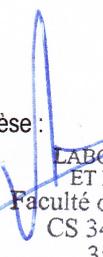
TITRE DE LA THESE

RÔLE DES RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX  
PROTÉINES G ADRENERGIQUES DANS LA  
TOXICITÉ DES HYDROCARBURES AROMATIQUES  
POLYCYCLIQUES

- 5 JAN. 2016

Rennes, le

Le Président de thèse :

  
**Prof. Vincent LAGENTE**  
INSERM UMR 991  
LABORATOIRE DE PHARMACODYNAMIE  
ET PHARMACOLOGIE MOLECULAIRE  
Faculté de Pharmacie, Université de Rennes 1  
CS 34317 - 2, av du Prof Léon Bernard  
35043 RENNES Cedex, France

Le Directeur de thèse :

  
E. LE FERRÉC

VU et Permis d'imprimer

Le Président de l'Université de Rennes1.

  
G. CATHELINÉAU

# Bibliographie

---

1. Doornaert B, Pichard A. Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) [Internet]. INERIS; 2006 [cited 2015 Sep 15]. Available from: [http://www.ineris.fr/centredoc/HAP\\_4.pdf](http://www.ineris.fr/centredoc/HAP_4.pdf)
2. Meador JP, Stein JE, Reichert WL, Varanasi U. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. *Rev Environ Contam Toxicol.* 1995;143:79–165.
3. Becking GC, Chen BH. International Programme on Chemical Safety (IPCS) environmental health criteria on boron human health risk assessment. *Biol Trace Elem Res.* 1998;66(1-3):439–52.
4. Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003 Oct;3(10):733–44.
5. WHO. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons : guideline for drinking water quality. WHO; 1998.
6. Journal Officiel des Communautés Européennes. Directive 98/83/CE du Conseil du 3 novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine. [Consulté le 17/09/2015] [Internet]. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:330:0032:0054:fr:PDF>
7. Phillips DH. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat Res.* 1999 Jul 15;443(1-2):139–47.
8. HSBD. Benzo[a]pyrene [Internet]. U.S. National Library of Medicine; 2000 [cited 2015 Oct 17]. Available from: <http://www.toxnet.nlm.nih.gov>
9. Head IM, Jones DM, Röling WFM. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat Rev Microbiol.* 2006 Mar;4(3):173–82.
10. Samanta SK, Singh OV, Jain RK. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.* 2002 Jun;20(6):243–8.
11. Grosser RJ, Warshawsky D, Vestal JR. Indigenous and enhanced mineralization of pyrene, benzo[a]pyrene, and carbazole in soils. *Appl Environ Microbiol.* 1991 Dec;57(12):3462–9.
12. Heitkamp MA, Cerniglia CE. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a *Mycobacterium* sp. in microcosms containing sediment and water from a pristine ecosystem. *Appl Environ Microbiol.* 1989 Aug;55(8):1968–73.
13. Schneider J, Grosser R, Jayasimhulu K, Xue W, Warshawsky D. Degradation of pyrene, benz[a]anthracene, and benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135,

- isolated from a former coal gasification site. *Appl Environ Microbiol*. 1996 Jan;62(1):13–9.
14. Desai AM, Autenrieth RL, Dimitriou-Christidis P, McDonald TJ. Biodegradation kinetics of select polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures by *Sphingomonas paucimobilis* EPA505. *Biodegradation*. 2008 Apr;19(2):223–33.
  15. Kanaly RA, Harayama S, Watanabe K. *Rhodanobacter* sp. strain BPC1 in a benzo[a]pyrene-mineralizing bacterial consortium. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Dec;68(12):5826–33.
  16. Juhasz AL, Stanley GA, Britz ML. Metabolite repression inhibits degradation of benzo[a]pyrene and dibenz[a,h]anthracene by *Stenotrophomonas maltophilia* VUN 10,003. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2002 Feb;28(2):88–96.
  17. Chen Z, Boreham J. Smoking and cardiovascular disease. *Semin Vasc Med*. 2002 Aug;2(3):243–52.
  18. Jules GE, Pratap S, Ramesh A, Hood DB. In utero exposure to benzo(a)pyrene predisposes offspring to cardiovascular dysfunction in later-life. *Toxicology*. 2012 May 16;295(1-3):56–67.
  19. Westmaas JL, Brandon TH. Reducing risk in smokers. *Curr Opin Pulm Med*. 2004 Jul;10(4):284–8.
  20. Steenland K, Bertazzi P, Baccarelli A, Kogevinas M. Dioxin revisited: developments since the 1997 IARC classification of dioxin as a human carcinogen. *Environ Health Perspect*. 2004 Sep;112(13):1265–8.
  21. Korashy HM, El-Kadi AOS. The role of aryl hydrocarbon receptor in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *Drug Metab Rev*. 2006;38(3):411–50.
  22. Arehart E, Giasson G, Walsh MT, Patterson H. Dioxin alters the human low-density and very low-density lipoprotein structure with evidence for specific quenching of Trp-48 in apolipoprotein C-II. *Biochemistry (Mosc)*. 2004 Jul 6;43(26):8503–9.
  23. Podechard N, Le Ferrec E, Rebillard A, Fardel O, Lecureur V. NPC1 repression contributes to lipid accumulation in human macrophages exposed to environmental aryl hydrocarbons. *Cardiovasc Res*. 2009 May 1;82(2):361–70.
  24. Curfs DMJ, Knaapen AM, Pachen DMFA, Gijbels MJJ, Lutgens E, Smook MLF, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons induce an inflammatory atherosclerotic plaque phenotype irrespective of their DNA binding properties. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2005 Aug;19(10):1290–2.
  25. Godschalk R, Curfs D, Bartsch H, Van Schooten F-J, Nair J. Benzo[a]pyrene enhances lipid peroxidation induced DNA damage in aorta of apolipoprotein E knockout mice. *Free Radic Res*. 2003 Dec;37(12):1299–305.
  26. Knaapen AM, Curfs DM, Pachen DM, Gottschalk RW, de Winther MPJ, Daemen MJ, et

- al. The environmental carcinogen benzo[a]pyrene induces expression of monocyte-chemoattractant protein-1 in vascular tissue: a possible role in atherogenesis. *Mutat Res.* 2007 Aug 1;621(1-2):31–41.
27. Stevens EA, Mezrich JD, Bradfield CA. The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system. *Immunology.* 2009 Jul;127(3):299–311.
  28. Veldhoen M. A toxin-sensitive receptor able to reduce immunopathology. *Nat Immunol.* 2010 Sep;11(9):779–81.
  29. Veldhoen M, Duarte JH. The aryl hydrocarbon receptor: fine-tuning the immune-response. *Curr Opin Immunol.* 2010 Dec;22(6):747–52.
  30. Lecureur V, Ferrec EL, N'diaye M, Vee ML, Gardyn C, Gilot D, et al. ERK-dependent induction of TNFalpha expression by the environmental contaminant benzo(a)pyrene in primary human macrophages. *FEBS Lett.* 2005 Mar 28;579(9):1904–10.
  31. N'Diaye M, Le Ferrec E, Lagadic-Gossmann D, Corre S, Gilot D, Lecureur V, et al. Aryl hydrocarbon receptor- and calcium-dependent induction of the chemokine CCL1 by the environmental contaminant benzo[a]pyrene. *J Biol Chem.* 2006 Jul 21;281(29):19906–15.
  32. Pacheco KA, Tarkowski M, Sterritt C, Negri J, Rosenwasser LJ, Borish L. The influence of diesel exhaust particles on mononuclear phagocytic cell-derived cytokines: IL-10, TGF-beta and IL-1 beta. *Clin Exp Immunol.* 2001 Dec;126(3):374–83.
  33. Kepley CL, Lauer FT, Oliver JM, Burchiel SW. Environmental polycyclic aromatic hydrocarbons, benzo(a) pyrene (BaP) and BaP-quinones, enhance IgE-mediated histamine release and IL-4 production in human basophils. *Clin Immunol Orlando Fla.* 2003 Apr;107(1):10–9.
  34. Boland S, Baeza-Squiban A, Bonvallet V, Houcine O, Pain C, Meyer M, et al. Similar cellular effects induced by diesel exhaust particles from a representative diesel vehicle recovered from filters and Standard Reference Material 1650. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA.* 2001 Oct;15(4-5):379–85.
  35. Pandya RJ, Solomon G, Kinner A, Balmes JR. Diesel exhaust and asthma: hypotheses and molecular mechanisms of action. *Environ Health Perspect.* 2002 Feb;110 Suppl 1:103–12.
  36. Polosa R, Salvi S, Di Maria GU. Allergic susceptibility associated with diesel exhaust particle exposure: clear as mud. *Arch Environ Health.* 2002 Jun;57(3):188–93.
  37. Davila DR, Davis DP, Campbell K, Cambier JC, Zigmond LA, Burchiel SW. Role of alterations in Ca(2+)-associated signaling pathways in the immunotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Toxicol Environ Health.* 1995 Jun;45(2):101–26.
  38. Thurmond LM, Lauer LD, House RV, Cook JC, Dean JH. Immunosuppression following exposure to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) in Ah-responsive and Ah-

- nonresponsive mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1987 Dec;91(3):450–60.
39. Laupeze B, Amiot L, Sparfel L, Le Ferrec E, Fauchet R, Fardel O. Polycyclic aromatic hydrocarbons affect functional differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002 Mar 15;168(6):2652–8.
  40. van Grevenynghe J, Rion S, Le Ferrec E, Le Vee M, Amiot L, Fauchet R, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit differentiation of human monocytes into macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003 Mar 1;170(5):2374–81.
  41. van Grevenynghe J, Sparfel L, Le Vee M, Gilot D, Drenou B, Fauchet R, et al. Cytochrome P450-dependent toxicity of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons towards human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 May 7;317(3):708–16.
  42. Gradin K, Toftgård R, Poellinger L, Berghard A. Repression of dioxin signal transduction in fibroblasts. Identification Of a putative repressor associated with Arnt. *J Biol Chem*. 1999 May 7;274(19):13511–8.
  43. Jux B, Kadow S, Esser C. Langerhans cell maturation and contact hypersensitivity are impaired in aryl hydrocarbon receptor-null mice. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009 Jun 1;182(11):6709–17.
  44. Villano CM, Murphy KA, Akintobi A, White LA. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces matrix metalloproteinase (MMP) expression and invasion in A2058 melanoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006 Feb 1;210(3):212–24.
  45. Swanson HI. Cytochrome P450 expression in human keratinocytes: an aryl hydrocarbon receptor perspective. *Chem Biol Interact*. 2004 Oct 15;149(2-3):69–79.
  46. Ikuta T, Kawajiri K. Zinc finger transcription factor Slug is a novel target gene of aryl hydrocarbon receptor. *Exp Cell Res*. 2006 Nov 1;312(18):3585–94.
  47. Yamamoto O, Tokura Y. Photocontact dermatitis and chloracne: two major occupational and environmental skin diseases induced by different actions of halogenated chemicals. *J Dermatol Sci*. 2003 Aug;32(2):85–94.
  48. Poland A, Glover E. Variation in the molecular mass of the Ah receptor among vertebrate species and strains of rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987 Aug 14;146(3):1439–49.
  49. Dolwick KM, Schmidt JV, Carver LA, Swanson HI, Bradfield CA. Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA. *Mol Pharmacol*. 1993 Nov;44(5):911–7.
  50. Abbott BD, Birnbaum LS, Perdew GH. Developmental expression of two members of a new class of transcription factors: I. Expression of aryl hydrocarbon receptor in the C57BL/6N mouse embryo. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat*. 1995 Oct;204(2):133–43.
  51. Hahn ME. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact*. 2002 Sep 20;141(1-2):131–60.

52. Fernandez-Salguero PM, Ward JM, Sundberg JP, Gonzalez FJ. Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice. *Vet Pathol.* 1997 Nov;34(6):605–14.
53. Lahvis GP, Lindell SL, Thomas RS, McCuskey RS, Murphy C, Glover E, et al. Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Sep 12;97(19):10442–7.
54. Baba T, Mimura J, Nakamura N, Harada N, Yamamoto M, Morohashi K-I, et al. Intrinsic function of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor as a key factor in female reproduction. *Mol Cell Biol.* 2005 Nov;25(22):10040–51.
55. Fernandez-Salguero P, Pineau T, Hilbert DM, McPhail T, Lee SS, Kimura S, et al. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science.* 1995 May 5;268(5211):722–6.
56. Gonzalez FJ, Fernandez-Salguero P, Lee SS, Pineau T, Ward JM. Xenobiotic receptor knockout mice. *Toxicol Lett.* 1995 Dec;82-83:117–21.
57. Schmidt JV, Su GH, Reddy JK, Simon MC, Bradfield CA. Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jun 25;93(13):6731–6.
58. Petrusis JR, Perdew GH. The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex. *Chem Biol Interact.* 2002 Sep 20;141(1-2):25–40.
59. Swanson HI, Chan WK, Bradfield CA. DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins. *J Biol Chem.* 1995 Nov 3;270(44):26292–302.
60. Gouédard C, Barouki R, Morel Y. Dietary polyphenols increase paraoxonase 1 gene expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependent mechanism. *Mol Cell Biol.* 2004 Jun;24(12):5209–22.
61. Denison MS, Rogers JM, Rushing SR, Jones CL, Tetangco SC, Heath-Pagliuso S. Analysis of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) signal transduction pathway. *Curr Protoc Toxicol* Editor Board Mahin Maines Ed--Chief AI. 2002 May;Chapter 4:Unit4.8.
62. Shen ES, Whitlock JP. Protein-DNA interactions at a dioxin-responsive enhancer. Mutational analysis of the DNA-binding site for the liganded Ah receptor. *J Biol Chem.* 1992 Apr 5;267(10):6815–9.
63. Beischlag TV, Luis Morales J, Hollingshead BD, Perdew GH. The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2008;18(3):207–50.
64. Nebert DW, Gonzalez FJ. P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu Rev Biochem.* 1987;56:945–93.
65. Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, Gonzalez FJ. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J Biol Chem.* 2004 Jun 4;279(23):23847–50.

66. Yueh M-F, Huang Y-H, Hiller A, Chen S, Nguyen N, Tukey RH. Involvement of the xenobiotic response element (XRE) in Ah receptor-mediated induction of human UDP-glucuronosyltransferase 1A1. *J Biol Chem*. 2003 Apr 25;278(17):15001–6.
67. Münzel PA, Lehmköster T, Brück M, Ritter JK, Bock KW. Aryl hydrocarbon receptor-inducible or constitutive expression of human UDP glucuronosyltransferase UGT1A6. *Arch Biochem Biophys*. 1998 Feb 1;350(1):72–8.
68. Rushmore TH, Pickett CB. Transcriptional regulation of the rat glutathione S-transferase Ya subunit gene. Characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants. *J Biol Chem*. 1990 Aug 25;265(24):14648–53.
69. Jaiswal AK. Human NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene structure and induction by dioxin. *Biochemistry (Mosc)*. 1991 Nov 5;30(44):10647–53.
70. Lyte M, Bick PH. Modulation of interleukin-1 production by macrophages following benzo(a)pyrene exposure. *Int J Immunopharmacol*. 1986;8(3):377–81.
71. Jeon MS, Esser C. The murine IL-2 promoter contains distal regulatory elements responsive to the Ah receptor, a member of the evolutionarily conserved bHLH-PAS transcription factor family. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2000 Dec 15;165(12):6975–83.
72. Vogel CFA, Sciuillo E, Li W, Wong P, Lazennec G, Matsumura F. RelB, a new partner of aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription. *Mol Endocrinol Baltim Md*. 2007 Dec;21(12):2941–55.
73. Hoffer A, Chang CY, Puga A. Dioxin induces transcription of fos and jun genes by Ah receptor-dependent and -independent pathways. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1996 Nov;141(1):238–47.
74. Marlowe JL, Knudsen ES, Schwemberger S, Puga A. The aryl hydrocarbon receptor displaces p300 from E2F-dependent promoters and represses S phase-specific gene expression. *J Biol Chem*. 2004 Jul 9;279(28):29013–22.
75. Matikainen T, Perez GI, Jurisicova A, Pru JK, Schlezinger JJ, Ryu HY, et al. Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. *Nat Genet*. 2001 Aug;28(4):355–60.
76. Miao W, Hu L, Scrivens PJ, Batist G. Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. *J Biol Chem*. 2005 May 27;280(21):20340–8.
77. Mimura J, Ema M, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev*. 1999 Jan 1;13(1):20–5.
78. Xue W, Warshawsky D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic

- hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005 Aug 1;206(1):73–93.
79. Miller KP, Ramos KS. Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons. *Drug Metab Rev.* 2001 Feb;33(1):1–35.
  80. Albert RE, Miller ML, Cody T, Andringa A, Shukla R, Baxter CS. Benzo[a]pyrene-induced skin damage and tumor promotion in the mouse. *Carcinogenesis.* 1991 Jul;12(7):1273–80.
  81. Arnould JP, Kubiak R, Belowski J, Belegaud J, Szczeklik J. Detection of benzo[a]pyrene-DNA adducts in leukocytes of coke oven workers. *Pathol Biol.* 2000;48(6):548–53.
  82. Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene.* 2002 Oct 21;21(48):7435–51.
  83. Dipple A, Peltonen K, Cheng SC, Ross H, Bigger CA. Chemical and mutagenic specificities of polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogens. *Adv Exp Med Biol.* 1994;354:101–12.
  84. Shimizu Y, Nakatsuru Y, Ichinose M, Takahashi Y, Kume H, Mimura J, et al. Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jan 18;97(2):779–82.
  85. Smithgall TE, Harvey RG, Penning TM. Spectroscopic identification of ortho-quinones as the products of polycyclic aromatic trans-dihydrodiol oxidation catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase. A potential route of proximate carcinogen metabolism. *J Biol Chem.* 1988 Feb 5;263(4):1814–20.
  86. Penning TM, Ohnishi ST, Ohnishi T, Harvey RG. Generation of reactive oxygen species during the enzymatic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiols catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase. *Chem Res Toxicol.* 1996 Feb;9(1):84–92.
  87. Penning TM, Burczynski ME, Hung CF, McCoull KD, Palackal NT, Tsuruda LS. Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: generation of reactive and redox active o-quinones. *Chem Res Toxicol.* 1999 Jan;12(1):1–18.
  88. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 1997 Jun 5;387(6633):569–72.
  89. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000 Oct;1(1):31–9.
  90. London E. Insights into lipid raft structure and formation from experiments in model membranes. *Curr Opin Struct Biol.* 2002 Aug;12(4):480–6.
  91. Rebillard A, Tekpli X, Meurette O, Sergent O, LeMoigne-Muller G, Vernhet L, et al. Cisplatin-induced apoptosis involves membrane fluidification via inhibition of NHE1 in

- human colon cancer cells. *Cancer Res.* 2007 Aug 15;67(16):7865–74.
92. Nourissat P, Travert M, Chevanne M, Tekpli X, Rebillard A, Le Moigne-Müller G, et al. Ethanol induces oxidative stress in primary rat hepatocytes through the early involvement of lipid raft clustering. *Hepatology* Baltim Md. 2008 Jan;47(1):59–70.
  93. Tekpli X, Rissel M, Huc L, Catheline D, Sergent O, Rioux V, et al. Membrane remodeling, an early event in benzo[a]pyrene-induced apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010 Feb 15;243(1):68–76.
  94. Dendelé B, Tekpli X, Hardonnière K, Holme JA, Debure L, Catheline D, et al. Protective action of n-3 fatty acids on benzo[a]pyrene-induced apoptosis through the plasma membrane remodeling-dependent NHE1 pathway. *Chem Biol Interact.* 2014 Jan 25;207:41–51.
  95. Gloerich M, Bos JL. Epac: defining a new mechanism for cAMP action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2010;50:355–75.
  96. Rich TC, Karpen JW. Review article: cyclic AMP sensors in living cells: what signals can they actually measure? *Ann Biomed Eng.* 2002 Sep;30(8):1088–99.
  97. Vogel CFA, Sciallo E, Park S, Liedtke C, Trautwein C, Matsumura F. Dioxin increases C/EBP $\beta$  transcription by activating cAMP/protein kinase A. *J Biol Chem.* 2004 Mar 5;279(10):8886–94.
  98. Oesch-Bartlomowicz B, Oesch F. Role of cAMP in mediating AHR signaling. *Biochem Pharmacol.* 2009 Feb 15;77(4):627–41.
  99. Krieger JA, Born JL, Burchiel SW. Persistence of calcium elevation in the HPB-ALL human T cell line correlates with immunosuppressive properties of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1994 Aug;127(2):268–74.
  100. Mayati A, Le Ferrec E, Lagadic-Gossmann D, Fardel O. Aryl hydrocarbon receptor-independent up-regulation of intracellular calcium concentration by environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in human endothelial HMEC-1 cells. *Environ Toxicol.* 2012 Sep;27(9):556–62.
  101. Kobayashi D, Ahmed S, Ishida M, Kasai S, Kikuchi H. Calcium/calmodulin signaling elicits release of cytochrome c during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced apoptosis in the human lymphoblastic T-cell line, L-MAT. *Toxicology.* 2009 Apr 5;258(1):25–32.
  102. Le Ferrec E, Lagadic-Gossmann D, Rauch C, Bardiau C, Maheo K, Massiere F, et al. Transcriptional induction of CYP1A1 by oltipraz in human Caco-2 cells is aryl hydrocarbon receptor- and calcium-dependent. *J Biol Chem.* 2002 Jul 5;277(27):24780–7.
  103. Li Z, Carter JD, Dailey LA, Huang Y-CT. Pollutant particles produce vasoconstriction and enhance MAPK signaling via angiotensin type I receptor. *Environ Health Perspect.*

- 2005 Aug;113(8):1009–14.
104. Bisset KM, Dhopeswarkar AS, Liao C, Nicholson RA. The G protein-coupled cannabinoid-1 (CB1) receptor of mammalian brain: inhibition by phthalate esters in vitro. *Neurochem Int.* 2011 Oct;59(5):706–13.
  105. Cui L, Li J, Xie X. Rediocide A, an Insecticide, induces G-protein-coupled receptor desensitization via activation of conventional protein kinase C. *J Nat Prod.* 2012 Jun 22;75(6):1058–62.
  106. Mizuo K, Narita M, Yoshida T, Narita M, Suzuki T. Functional changes in dopamine D3 receptors by prenatal and neonatal exposure to an endocrine disruptor bisphenol-A in mice. *Addict Biol.* 2004 Mar;9(1):19–25.
  107. Ishido M, Morita M, Oka S, Masuo Y. Alteration of gene expression of G protein-coupled receptors in endocrine disruptors-caused hyperactive rats. *Regul Pept.* 2005 Mar 15;126(1-2):145–53.
  108. Kobilka BK. G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Apr;1768(4):794–807.
  109. Fredriksson R, Schiöth HB. The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol Pharmacol.* 2005 May;67(5):1414–25.
  110. Deupi X, Kobilka BK. Energy landscapes as a tool to integrate GPCR structure, dynamics, and function. *Physiol Bethesda Md.* 2010 Oct;25(5):293–303.
  111. Hill SJ. G-protein-coupled receptors: past, present and future. *Br J Pharmacol.* 2006 Jan;147 Suppl 1:S27–37.
  112. Ma P, Zimmel R. Value of novelty? *Nat Rev Drug Discov.* 2002 Aug;1(8):571–2.
  113. Probst WC, Snyder LA, Schuster DI, Brosius J, Sealfon SC. Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol.* 1992 Feb;11(1):1–20.
  114. Zheng H, Pearsall EA, Hurst DP, Zhang Y, Chu J, Zhou Y, et al. Palmitoylation and membrane cholesterol stabilize  $\mu$ -opioid receptor homodimerization and G protein coupling. *BMC Cell Biol.* 2012;13:6.
  115. Schiöth HB, Fredriksson R. The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen Comp Endocrinol.* 2005 May 15;142(1-2):94–101.
  116. Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin L-G, Schiöth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol.* 2003 Jun;63(6):1256–72.
  117. Mayer ML, Armstrong N. Structure and function of glutamate receptor ion channels. *Annu Rev Physiol.* 2004;66:161–81.

118. Felder CB, Graul RC, Lee AY, Merkle HP, Sadee W. The Venus flytrap of periplasmic binding proteins: an ancient protein module present in multiple drug receptors. *AAPS PharmSci*. 1999;1(2):E2.
119. Kunishima N, Shimada Y, Tsuji Y, Sato T, Yamamoto M, Kumasaka T, et al. Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature*. 2000 Oct 26;407(6807):971–7.
120. Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, et al. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*. 2000 Aug 4;289(5480):739–45.
121. Huang H-C, Klein PS. The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biol*. 2004;5(7):234.
122. Malbon CC. Frizzleds: new members of the superfamily of G-protein-coupled receptors. *Front Biosci J Virtual Libr*. 2004 May 1;9:1048–58.
123. Behrens M, Brockhoff A, Kuhn C, Bufe B, Winnig M, Meyerhof W. The human taste receptor hTAS2R14 responds to a variety of different bitter compounds. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jun 25;319(2):479–85.
124. Harmar AJ. Family-B G-protein-coupled receptors. *Genome Biol*. 2001;2(12):REVIEWS3013.
125. Downes GB, Gautam N. The G protein subunit gene families. *Genomics*. 1999 Dec 15;62(3):544–52.
126. Anderson GP. Current issues with beta2-adrenoceptor agonists: pharmacology and molecular and cellular mechanisms. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2006 Dec;31(2-3):119–30.
127. McGraw DW, Muhlbachler KA, Schwarb MR, Rahman FF, Small KM, Almoosa KF, et al. Airway smooth muscle prostaglandin-EP1 receptors directly modulate beta2-adrenergic receptors within a unique heterodimeric complex. *J Clin Invest*. 2006 May;116(5):1400–9.
128. Larue D, Kato G. Reduced number of alpha- and beta-adrenergic receptors in the myocardium of rats exposed to tobacco smoke. *Eur J Pharmacol*. 1981 Apr 9;70(4):519–29.
129. Laustiola KE, Lassila R, Kaprio J, Koskenvuo M. Decreased beta-adrenergic receptor density and catecholamine response in male cigarette smokers. A study of monozygotic twin pairs discordant for smoking. *Circulation*. 1988 Nov;78(5 Pt 1):1234–40.
130. Laustiola KE, Kotamäki M, Lassila R, Kallioniemi OP, Manninen V. Cigarette smoking alters sympathoadrenal regulation by decreasing the density of beta 2-adrenoceptors. A study of monitored smoking cessation. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1991 Jun;17(6):923–

- 8.
131. Irigaray P, Ogier V, Jacquenet S, Notet V, Sibille P, Méjean L, et al. Benzo[a]pyrene impairs beta-adrenergic stimulation of adipose tissue lipolysis and causes weight gain in mice. A novel molecular mechanism of toxicity for a common food pollutant. *FEBS J*. 2006 Apr;273(7):1362–72.
  132. Factor P, Akhmedov AT, McDonald JD, Qu A, Wu J, Jiang H, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons impair function of  $\beta$ 2-adrenergic receptors in airway epithelial and smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011 Nov;45(5):1045–9.
  133. Canga L, Levi R, Rifkind AB. Heart as a target organ in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity: decreased beta-adrenergic responsiveness and evidence of increased intracellular calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Feb;85(3):905–9.
  134. Canga L, Paroli L, Blanck TJ, Silver RB, Rifkind AB. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin increases cardiac myocyte intracellular calcium and progressively impairs ventricular contractile responses to isoproterenol and to calcium in chick embryo hearts. *Mol Pharmacol*. 1993 Dec;44(6):1142–51.
  135. Sommer RJ, Hume AJ, Ciak JM, Vannostrand JJ, Friggens M, Walker MK. Early developmental 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure decreases chick embryo heart chronotropic response to isoproterenol but not to agents affecting signals downstream of the beta-adrenergic receptor. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. 2005 Feb;83(2):363–71.
  136. Brodde OE, Michel MC. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev*. 1999 Dec;51(4):651–90.
  137. Xiao RP, Ji X, Lakatta EG. Functional coupling of the beta 2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol Pharmacol*. 1995 Feb;47(2):322–9.
  138. Xiao R-P, Zhang S-J, Chakir K, Avdonin P, Zhu W, Bond RA, et al. Enhanced G(i) signaling selectively negates beta2-adrenergic receptor (AR)--but not beta1-AR-mediated positive inotropic effect in myocytes from failing rat hearts. *Circulation*. 2003 Sep 30;108(13):1633–9.
  139. Pönicke K, Gröner F, Heinroth-Hoffmann I, Brodde O-E. Agonist-specific activation of the beta2-adrenoceptor/Gs-protein and beta2-adrenoceptor/Gi-protein pathway in adult rat ventricular cardiomyocytes. *Br J Pharmacol*. 2006 Apr;147(7):714–9.
  140. Begonha R, Moura D, Guimarães S. Vascular beta-adrenoceptor-mediated relaxation and the tone of the tissue in canine arteries. *J Pharm Pharmacol*. 1995 Jun;47(6):510–3.
  141. Ferro A, Queen LR, Priest RM, Xu B, Ritter JM, Poston L, et al. Activation of nitric oxide synthase by beta 2-adrenoceptors in human umbilical vein endothelium in vitro. *Br J Pharmacol*. 1999 Apr;126(8):1872–80.

142. Gray DW, Marshall I. Novel signal transduction pathway mediating endothelium-dependent beta-adrenoceptor vasorelaxation in rat thoracic aorta. *Br J Pharmacol.* 1992 Nov;107(3):684–90.
143. Johnson M. Beta2-adrenoceptors: mechanisms of action of beta2-agonists. *Paediatr Respir Rev.* 2001 Mar;2(1):57–62.
144. Arinze IJ, Kawai Y. Adrenergic regulation of glycogenolysis in isolated guinea-pig hepatocytes: evidence that beta 2-receptors mediate catecholamine stimulation of glycogenolysis. *Arch Biochem Biophys.* 1983 Aug;225(1):196–202.
145. Kawai Y, Arinze IJ. beta-Adrenergic receptors in rabbit liver plasma membranes. Predominance of beta 2-receptors and mediation of adrenergic regulation of hepatic glycogenolysis. *J Biol Chem.* 1983 Apr 10;258(7):4364–71.
146. Carron J, Morel C, Blum JW, Hammon HM. Effects of dexamethasone and colostrum feeding on mRNA levels and binding capacities of beta-adrenergic receptors in the liver of neonatal calves. *Domest Anim Endocrinol.* 2005 Apr;28(3):257–71.
147. McCorry LK. Physiology of the autonomic nervous system. *Am J Pharm Educ.* 2007 Aug 15;71(4):78.
148. Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature.* 1997 Nov 6;390(6655):88–91.
149. Offermanns S, Simon MI. G alpha 15 and G alpha 16 couple a wide variety of receptors to phospholipase C. *J Biol Chem.* 1995 Jun 23;270(25):15175–80.
150. Wu D, Kuang Y, Wu Y, Jiang H. Selective coupling of beta 2-adrenergic receptor to hematopoietic-specific G proteins. *J Biol Chem.* 1995 Jul 7;270(27):16008–10.
151. Zhu X, Gilbert S, Birnbaumer M, Birnbaumer L. Dual signaling potential is common among Gs-coupled receptors and dependent on receptor density. *Mol Pharmacol.* 1994 Sep;46(3):460–9.
152. Liggett SB. Update on current concepts of the molecular basis of beta2-adrenergic receptor signaling. *J Allergy Clin Immunol.* 2002 Dec;110(6 Suppl):S223–7.
153. Brzostowski JA, Kimmel AR. Signaling at zero G: G-protein-independent functions for 7-TM receptors. *Trends Biochem Sci.* 2001 May;26(5):291–7.
154. Heuss C, Gerber U. G-protein-independent signaling by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci.* 2000 Oct;23(10):469–75.
155. Rajagopal K, Lefkowitz RJ, Rockman HA. When 7 transmembrane receptors are not G protein-coupled receptors. *J Clin Invest.* 2005 Nov;115(11):2971–4.
156. Hall RA, Premont RT, Chow CW, Blitzer JT, Pitcher JA, Claing A, et al. The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger regulatory factor to control

- Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *Nature*. 1998 Apr 9;392(6676):626–30.
157. Sun Y, McGarrigle D, Huang X-Y. When a G protein-coupled receptor does not couple to a G protein. *Mol Biosyst*. 2007 Dec;3(12):849–54.
  158. Lefkowitz RJ, Shenoy SK. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*. 2005 Apr 22;308(5721):512–7.
  159. Luttrell LM, Lefkowitz RJ. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci*. 2002 Feb 1;115(Pt 3):455–65.
  160. Shenoy SK, Drake MT, Nelson CD, Houtz DA, Xiao K, Madabushi S, et al. beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J Biol Chem*. 2006 Jan 13;281(2):1261–73.
  161. Azzi M, Charest PG, Angers S, Rousseau G, Kohout T, Bouvier M, et al. Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 30;100(20):11406–11.
  162. Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, et al. Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science*. 1999 Jan 29;283(5402):655–61.
  163. Romero G, von Zastrow M, Friedman PA. Role of PDZ proteins in regulating trafficking, signaling, and function of GPCRs: means, motif, and opportunity. *Adv Pharmacol San Diego Calif*. 2011;62:279–314.
  164. Weinman EJ, Steplock D, Tate K, Hall RA, Spurney RF, Shenolikar S. Structure-function of recombinant Na/H exchanger regulatory factor (NHE-RF). *J Clin Invest*. 1998 May 15;101(10):2199–206.
  165. Wheeler D, Sneddon WB, Wang B, Friedman PA, Romero G. NHERF-1 and the cytoskeleton regulate the traffic and membrane dynamics of G protein-coupled receptors. *J Biol Chem*. 2007 Aug 24;282(34):25076–87.
  166. Mayati A, Levoine N, Paris H, N'Diaye M, Courtois A, Uriac P, et al. Induction of intracellular calcium concentration by environmental benzo(a)pyrene involves a  $\beta$ 2-adrenergic receptor/adenylyl cyclase/Epac-1/inositol 1,4,5-trisphosphate pathway in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2012 Feb 3;287(6):4041–52.
  167. Schmidt M, Evellin S, Weernink PA, von Dorp F, Rehmann H, Lomasney JW, et al. A new phospholipase-C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap GTPase. *Nat Cell Biol*. 2001 Nov;3(11):1020–4.
  168. Keiper M, Stope MB, Szatkowski D, Böhm A, Tysack K, Vom Dorp F, et al. Epac- and Ca<sup>2+</sup>-controlled activation of Ras and extracellular signal-regulated kinases by Gs-coupled receptors. *J Biol Chem*. 2004 Nov 5;279(45):46497–508.

169. Bouvier M, Hausdorff WP, De Blasi A, O'Dowd BF, Kobilka BK, Caron MG, et al. Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature*. 1988 May 26;333(6171):370–3.
170. Hausdorff WP, Bouvier M, O'Dowd BF, Irons GP, Caron MG, Lefkowitz RJ. Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J Biol Chem*. 1989 Jul 25;264(21):12657–65.
171. Lefkowitz RJ. G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem*. 1998 Jul 24;273(30):18677–80.
172. Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ. G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:653–92.
173. Penn RB, Pronin AN, Benovic JL. Regulation of G protein-coupled receptor kinases. *Trends Cardiovasc Med*. 2000 Feb;10(2):81–9.
174. Benovic JL, Strasser RH, Caron MG, Lefkowitz RJ. Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 May;83(9):2797–801.
175. Li X, Huston E, Lynch MJ, Houslay MD, Baillie GS. Phosphodiesterase-4 influences the PKA phosphorylation status and membrane translocation of G-protein receptor kinase 2 (GRK2) in HEK-293beta2 cells and cardiac myocytes. *Biochem J*. 2006 Mar 1;394(Pt 2):427–35.
176. Tepe NM, Liggett SB. Functional receptor coupling to Gi is a mechanism of agonist-promoted desensitization of the beta2-adrenergic receptor. *J Recept Signal Transduct Res*. 2000 Jan;20(1):75–85.
177. Ruiz-Gómez A, Mayor F. Beta-adrenergic receptor kinase (GRK2) colocalizes with beta-adrenergic receptors during agonist-induced receptor internalization. *J Biol Chem*. 1997 Apr 11;272(15):9601–4.
178. Zhang J, Barak LS, Anborgh PH, Laporte SA, Caron MG, Ferguson SS. Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/beta-arrestin endocytic complexes. *J Biol Chem*. 1999 Apr 16;274(16):10999–1006.
179. Goodman OB, Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, et al. Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature*. 1996 Oct 3;383(6599):447–50.
180. Laporte SA, Oakley RH, Zhang J, Holt JA, Ferguson SS, Caron MG, et al. The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 30;96(7):3712–7.
181. Anborgh PH, Seachrist JL, Dale LB, Ferguson SS. Receptor/beta-arrestin complex

- formation and the differential trafficking and resensitization of beta2-adrenergic and angiotensin II type 1A receptors. *Mol Endocrinol Baltim Md.* 2000 Dec;14(12):2040–53.
182. Kallal L, Gagnon AW, Penn RB, Benovic JL. Visualization of agonist-induced sequestration and down-regulation of a green fluorescent protein-tagged beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem.* 1998 Jan 2;273(1):322–8.
  183. Yu SS, Lefkowitz RJ, Hausdorff WP. Beta-adrenergic receptor sequestration. A potential mechanism of receptor resensitization. *J Biol Chem.* 1993 Jan 5;268(1):337–41.
  184. Hermans E, Vanisberg MA, Geurts M, Maloteaux JM. Down-regulation of neurotensin receptors after ligand-induced internalization in rat primary cultured neurons. *Neurochem Int.* 1997 Aug;31(2):291–9.
  185. Tsao PI, von Zastrow M. Type-specific sorting of G protein-coupled receptors after endocytosis. *J Biol Chem.* 2000 Apr 14;275(15):11130–40.
  186. Krueger KM, Daaka Y, Pitcher JA, Lefkowitz RJ. The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *J Biol Chem.* 1997 Jan 3;272(1):5–8.
  187. Tholanikunnel BG, Malbon CC. A 20-nucleotide (A + U)-rich element of beta2-adrenergic receptor (beta2AR) mRNA mediates binding to beta2AR-binding protein and is obligate for agonist-induced destabilization of receptor mRNA. *J Biol Chem.* 1997 Apr 25;272(17):11471–8.
  188. Barreau C, Paillard L, Osborne HB. AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res.* 2005;33(22):7138–50.
  189. Danner S, Frank M, Lohse MJ. Agonist regulation of human beta2-adrenergic receptor mRNA stability occurs via a specific AU-rich element. *J Biol Chem.* 1998 Feb 6;273(6):3223–9.
  190. Pende A, Tremmel KD, DeMaria CT, Blaxall BC, Minobe WA, Sherman JA, et al. Regulation of the mRNA-binding protein AUF1 by activation of the beta-adrenergic receptor signal transduction pathway. *J Biol Chem.* 1996 Apr 5;271(14):8493–501.
  191. Bouvier M, Collins S, O’Dowd BF, Campbell PT, de Blasi A, Kobilka BK, et al. Two distinct pathways for cAMP-mediated down-regulation of the beta 2-adrenergic receptor. Phosphorylation of the receptor and regulation of its mRNA level. *J Biol Chem.* 1989 Oct 5;264(28):16786–92.
  192. Collins S, Bouvier M, Bolanowski MA, Caron MG, Lefkowitz RJ. cAMP stimulates transcription of the beta 2-adrenergic receptor gene in response to short-term agonist exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Jul;86(13):4853–7.
  193. Pippig S, Andexinger S, Lohse MJ. Sequestration and recycling of beta 2-adrenergic

- receptors permit receptor resensitization. *Mol Pharmacol*. 1995 Apr;47(4):666–76.
194. Shenoy SK, McDonald PH, Kohout TA, Lefkowitz RJ. Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science*. 2001 Nov 9;294(5545):1307–13.
  195. Shenoy SK, Xiao K, Venkataramanan V, Snyder PM, Freedman NJ, Weissman AM. Nedd4 mediates agonist-dependent ubiquitination, lysosomal targeting, and degradation of the beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem*. 2008 Aug 8;283(32):22166–76.
  196. Berthouze M, Venkataramanan V, Li Y, Shenoy SK. The deubiquitinases USP33 and USP20 coordinate beta2 adrenergic receptor recycling and resensitization. *EMBO J*. 2009 Jun 17;28(12):1684–96.
  197. Monopoli A, Conti A, Forlani A, Ongini E. Beta 1 and beta 2 adrenoceptors are involved in mediating vasodilation in the human coronary artery. *Pharmacol Res*. 1993 Apr;27(3):273–9.
  198. Bouskine A, Nebout M, Brücker-Davis F, Benahmed M, Fenichel P. Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor. *Environ Health Perspect*. 2009 Jul;117(7):1053–8.
  199. Lahousse SA, Beall SA, Johnson KJ. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate rapidly increases celsr2 protein phosphorylation in HeLa cells via protein kinase C and casein kinase 1. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. 2006 May;91(1):255–64.
  200. Brown-Woodman PD, Webster WS, Picker K, Huq F. In vitro assessment of individual and interactive effects of aromatic hydrocarbons on embryonic development of the rat. *Reprod Toxicol Elmsford N*. 1994 Apr;8(2):121–35.
  201. Slama R, Thiebaugeorges O, Goua V, Aussel L, Sacco P, Bohet A, et al. Maternal personal exposure to airborne benzene and intrauterine growth. *Environ Health Perspect*. 2009 Aug;117(8):1313–21.
  202. Bos I, De Boever P, Vanparijs J, Pattyn N, Panis LI, Meeusen R. Subclinical effects of aerobic training in urban environment. *Med Sci Sports Exerc*. 2013 Mar;45(3):439–47.
  203. Nukaya M, Walisser JA, Moran SM, Kennedy GD, Bradfield CA. Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in hepatocytes is required for aryl hydrocarbon receptor-mediated adaptive and toxic responses in liver. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. 2010 Dec;118(2):554–63.
  204. Jacob RF, Aleo MD, Self-Medlin Y, Doshna CM, Mason RP. 1,2-naphthoquinone stimulates lipid peroxidation and cholesterol domain formation in model membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013 Nov;54(12):7189–97.
  205. Sikkema J, de Bont JA, Poolman B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological

membranes. J Biol Chem. 1994 Mar 18;269(11):8022-8.

# **ANNEXE**

# **Résumé sous forme d'article des idées principales de la thèse**

# Rôle des récepteurs couplés aux protéines G adrénérgiques dans la toxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques

Thomas Déséchalliers<sup>1</sup>, Eric Le Ferrec<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Travail réalisé dans le cadre de la Thèse d'Exercice, Université de Rennes 1, Faculté de Pharmacie, 2 Avenue du Professeur Léon Bernard, 35043 Rennes, France

<sup>2</sup> EA 4427 SeRAIC/IRSET, IFR140, Université de Rennes 1, 2 Avenue du Professeur Léon Bernard, 35043 Rennes, France

**Mots-clés** : contaminants environnementaux ; hydrocarbure aromatique polycyclique ; benzo[a]pyrène ; récepteurs couplés aux protéines G ; récepteur bêta2-adrénérgique ; toxicité

---

Notre environnement possède toutes les ressources nécessaires à la vie. Mais il nous expose également à de nombreux contaminants pouvant mettre notre survie en péril. Ces contaminants sont ubiquitaires, présents aussi bien dans l'air que nous respirons, que dans l'eau ou les aliments. Leur existence naturelle dans les milieux, comme c'est le cas pour les métaux lourds, les parasites, les substances radioactives ou encore les hydrocarbures, est augmentée par les activités humaines. Malgré leur grande disparité géographique, les contaminants environnementaux peuvent avoir des conséquences sur tous les organismes vivants. En effet, ils possèdent de très nombreux effets toxiques, avec une action à plus ou moins long terme. Pour cela, ils peuvent cibler des récepteurs, véritables intermédiaires dans la transmission des informations à l'intérieur des cellules. Parmi ces récepteurs, on trouve les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ils forment une superfamille d'environ 360 récepteurs présents dans tous les tissus de l'organisme. Ce sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G. Les principales fonctions de l'organisme, dont la réponse cellulaire aux hormones et aux neurotransmetteurs, sont

contrôlées par ces récepteurs. Ce qui fait d'eux des cibles privilégiées à la fois pour les médicaments et les contaminants (1,2).

Parmi les contaminants de l'environnement ayant des effets toxiques chez l'Homme, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) sont très étudiés. En effet, du fait de leur omniprésence dans l'environnement sous forme de mélanges, ainsi que leurs effets délétères au niveau de l'organisme, ils représentent un risque en terme de santé publique. La distribution ubiquitaire de ces produits issus de la combustion incomplète des matières organiques est liée à la diversité des sources de production. Dans la nature, les rejets sont principalement liés aux feux de forêts et aux éruptions volcaniques ; alors que les sources anthropiques sont plus nombreuses : industries, combustion de matière organique provenant de carburant utilisé pour les transports ou le chauffage ou du mode de cuisson et à la fumée de cigarette. Le benzo[a]pyrène (B[a]P) est présent de façon quasi-systématique dans les mélanges de HAPs auxquels l'Homme est exposé, ce qui fait de lui le HAP de référence. Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) le classe

d'ailleurs comme cancérigène pour l'Homme (classe 1). Il est reconnu que ces composés jouent un rôle important dans l'apparition ou l'aggravation de nombreuses pathologies humaines graves, tels que les cancers et les maladies des systèmes cardiovasculaire et immunitaire (3–7).

Les effets toxiques des HAPs sont médiés par différentes voies, notamment celle liée à un récepteur cytosolique, le récepteur aux hydrocarbures aromatiques (RAh) (8). En outre, on sait désormais que ces molécules d'hydrocarbures ciblent les RCPG, comme la plupart des contaminants environnementaux. Actuellement, c'est principalement la liaison au récepteur bêta2-adrénergique (R $\beta$ 2-AD) qui est étudiée. Les travaux de *Mayati et al.* mettent en avant une interaction directe entre le B[a]P et le R $\beta$ 2-AD (9). En effet, les analyses de modélisation cellulaire suggèrent des contacts importants entre le B[a]P et les différents acides aminés aromatiques du R $\beta$ 2-AD. L'affinité du B[a]P est parmi les plus importantes relevées

pour les ligands du R $\beta$ 2-AD. Cela est en concordance avec les concentrations en HAPs auxquels l'Homme est régulièrement exposé. Bien que ces travaux doivent être complétés par des études pharmacologiques plus poussées, il semble que le B[a]P puisse être considéré comme un agoniste du R $\beta$ 2-AD. Il possède donc la capacité de perturber la signalisation physiologique de ce récepteur, et probablement des autres R $\beta$ -AD. En effet, le B[a]P est également capable de perturber l'expression et/ou l'activité du R $\beta$ 1-AD et du R $\beta$ 3-AD (10,11).

Pour être un agoniste, une molécule doit se lier de manière spécifique à un récepteur et provoquer les mêmes effets que le ligand physiologique. Pour le R $\beta$ 2-AD, il s'agit de l'épinéphrine. Si la fixation du B[a]P au R $\beta$ 2-AD entraîne une augmentation de la concentration calcique intracellulaire, de la même façon que l'épinéphrine, l'induction du taux d'AMPc intracellulaire par ce contaminant de l'environnement est quant à elle plus lente et moins importante. Il semble donc que le B[a]P

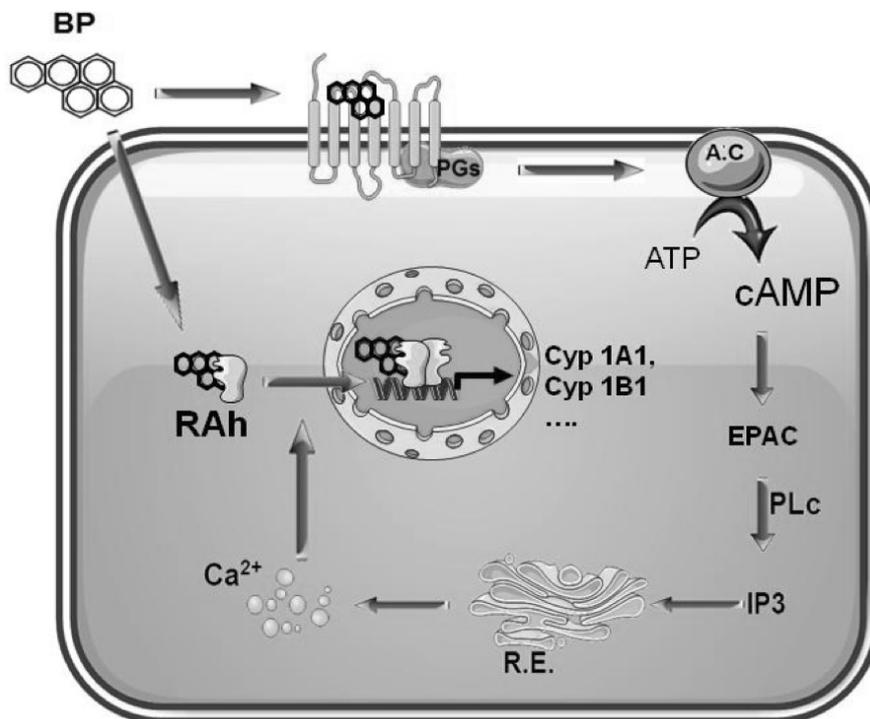


Figure : Schéma récapitulatif de l'action du B[a]P sur le R $\beta$ 2-AD et le RAh (9)

ne corresponde pas à la définition classique de l'agoniste et qu'il soit un mauvais agoniste.

Si le B[a]P apparaît comme un mauvais agoniste, il reste cependant évident qu'il possède la capacité de désensibiliser<sup>4</sup> de manière efficace le R $\beta$ 2-AD. La littérature démontre que la fixation de l'hydrocarbure sur les R $\beta$ 2-AD provoque une diminution de leur nombre à la surface cellulaire. En effet, l'exposition à la fumée de cigarette diminue le nombre de R $\beta$ 2-AD à la surface des lymphocytes humains (11,12) et des cellules cardiaques de rat (13). De même, le B[a]P peut atténuer la signalisation associée aux R $\beta$ -AD dans les adipocytes, défavorisant ainsi la lipolyse (10). En outre, les expériences de *Factor et al.* ont permis d'appuyer l'hypothèse de cette désensibilisation. Lors de ses travaux, il a été démontré que l'exposition chronique des cellules musculaires lisses pulmonaires aux mélanges de HAPs entraîne une forte réduction des R $\beta$ 2-AD au niveau protéique ainsi qu'au niveau des ARNm (14). Les HAPs peuvent donc entraver la relaxation des voies respiratoires médiée par la voie  $\beta$ 2-AD. Ainsi, une cellule, un organe ou l'organisme tout entier est incapable de répondre correctement à la stimulation physiologique provoquée par les ligands du R $\beta$ 2-AD, lors d'une exposition chronique aux HAPs. L'homéostasie est alors dérégulée.

Suite à ces observations, on peut supposer que l'exposition chronique aux HAPs peut jouer un rôle non négligeable dans la vitesse de survenue de certaines maladies chroniques, en particulier cardiovasculaires et pulmonaires (4). Les R $\beta$ 2-AD, qui sont présents au niveau des parois des coronaires (15), permettent d'adapter la vasodilatation et de réguler ainsi la perfusion cardiaque. Dans le cas d'un patient présentant a priori une faiblesse

---

<sup>4</sup> La désensibilisation est un processus d'autorégulation empêchant la sur-stimulation des récepteurs.

cardiaque, la désensibilisation des R $\beta$ 2-AD due aux HAPs pourrait empêcher la vasodilatation des coronaires et par conséquent engendrer des problèmes cardiaques potentiellement graves comme l'infarctus du myocarde. De la même façon, l'implication de ce récepteur et des HAPs dans l'apparition du syndrome métabolique<sup>5</sup> n'est actuellement pas démontrée mais il serait cependant légitime de se poser la question. En effet, le R $\beta$ 2-AD joue un rôle dans l'équilibre glycémique par action sur la glycogénolyse musculaire, la néoglucogenèse hépatique et la sécrétion d'insuline par les îlots de Langerhans du pancréas (16–18). Il intervient également dans le métabolisme des lipides.

Les HAPs, en se fixant sur le R $\beta$ 2-AD, entrent indirectement en compétition avec ses ligands physiologiques, tels que l'adrénaline et la noradrénaline. En effet, lorsque deux composés sont susceptibles d'interagir avec la même cible, on observe un phénomène de compétition. L'interaction des substances sera influencée par divers paramètres contrôlant cette compétition (qui contrôlent la liaison), dont la concentration des deux substances et leur affinité respective pour la cible. Ce phénomène peut entraîner une perturbation des fonctions physiologiques.

Au niveau des microdomaines<sup>6</sup> de la membrane plasmique, les HAPs engendrent une modification de la composition en cholestérol et en acides gras. Le remodelage membranaire alors induit régule l'alcalinisation intracellulaire, étape préalable au phénomène d'apoptose cellulaire (19,20). En outre, la formation

---

<sup>5</sup> Présence de plusieurs anomalies métaboliques associées : obésité abdominale, hypertriglycéridémie, HDL-cholestérol bas, intolérance au glucose ou diabète de type 2, hypertension artérielle.

<sup>6</sup> Également appelés rafts lipidiques, les microdomaines membranaires sont particulièrement riches en cholestérol et sphingolipides. Ils ont un rôle dans la régulation de la physiologie cellulaire.

d'espèces réactives de l'oxygène entraîne une oxydation des lipides membranaires, également appelée peroxydation lipidique, pouvant altérer la fonctionnalité des membranes, et notamment des récepteurs qui y sont ancrés (21). A terme, le fonctionnement de certains organes peut être modifié. Par ailleurs, l'action des HAPs sur les membranes conduit à des changements conformationnels de la bicouche de phospholipides, en particulier dans les environs des récepteurs (22). Cela peut notamment se traduire par une modification de la fluidité membranaire, caractéristique conditionnant le bon fonctionnement du R $\beta$ 2-AD, et des RCPG en général. Il est probable que les perturbations portent atteinte à la partie transmembranaire des récepteurs, modifiant ainsi leur activité.

Etant donné le nombre de RCPG et leur rôle fondamental dans la physiologie humaine et dans la réponse thérapeutique aux médicaments (environ 40% des médicaments ciblent les RCPG), et au vu de l'exposition importante aux HAPs, on peut craindre que la réponse pharmacologique attendue des médicaments soit modifiée. Actuellement aucune étude n'a abordé cette problématique mais on peut facilement imaginer qu'un médicament ciblant le R $\beta$ 2-AD ait une action différente de celle attendue au vu des résultats présentés précédemment. D'après les résultats de *Factor et al.*, les HAPs environnementaux peuvent ralentir la dilatation des voies respiratoires médiée par le R $\beta$ 2-AD (14). Ainsi, les polluants atmosphériques ne contribuent pas seulement à la pathogénicité de l'asthme, ils diminuent également la réponse thérapeutique aux médicaments. Une attention particulière devra donc être portée à l'exposition aux HAPs par la fumée de cigarette ou la pollution chez les patients asthmatiques traités par des agonistes  $\beta$ 2-adrénergiques, tel que le salbutamol (Ventoline®).

Une relation étroite entre les RCPG et les contaminants de l'environnement existe. En effet, de plus en plus de travaux démontrent que les contaminants environnementaux auxquels l'Homme est perpétuellement exposé interagissent directement ou indirectement avec les RCPG. Ainsi, les phtalates, le bisphénol A et les nonylphénols, issus de l'industrie du plastique, ont tous été associés à la perturbation de voies dépendantes des RCPG, en particulier dopaminergique (23–27). Cela démontre que l'aspect « perturbateur endocrinien » associé à ces molécules ne se solde pas uniquement par l'interaction avec les récepteurs aux hormones sexuelles.

Par ailleurs, le travail effectué ici ne s'intéresse qu'à l'étude d'une classe de RCPG et d'une classe de contaminants. Or il existe une multitude de classes de RCPG et de contaminants. Il est donc probable que chaque contaminant ait sa propre cible, différente du R $\beta$ 2-AD. Il serait alors intéressant d'étudier la place des autres RCPG dans les effets toxiques d'autres contaminants environnementaux.

Les professionnels de santé ont ici un rôle important de prévention. En effet, l'objectif majeur est de diminuer l'exposition aux contaminants environnementaux tels que les HAPs, mais également de diminuer leur émission à plus long terme. Les conseils que l'on pourra donner pour diminuer l'exposition sont liés au bon sens et au raisonnable. Il est évident que l'élimination des sources de contamination quelles qu'elles soient et l'usage des produits les moins toxiques pour l'Homme et l'environnement sont les premières mesures à mettre en place, et ce dans tous les domaines : domestiques (nettoyage, bricolage, chauffage, ...) et professionnels. Cependant, il est illusoire de croire que l'on peut éliminer tous risques d'exposition car ils sont directement liés à nos activités. Par contre, on peut proposer quelques solutions simples pour faire évoluer nos

habitudes, individuelles ou collectives, dans l'objectif de réduire les risques. D'une manière générale, il faut être particulièrement vigilant avec les personnes fragiles, tels que les enfants, les femmes enceintes, les personnes âgées, et souffrant de maladies chroniques. En effet, ils sont physiologiquement plus vulnérables et les conséquences d'une exposition aux contaminants peuvent se révéler plus délétères. Par exemple, une exposition aux HAPs chez la femme enceinte peut entraîner des malformations congénitales ou perturber le déroulement de la grossesse et le développement du fœtus en franchissant la barrière placentaire.

Voici une liste non exhaustive de quelques mesures simples pouvant être mise en place au quotidien :

- aérer les pièces de la maison
- ne pas obstruer les bouches de ventilation
- porter des protections adaptées (masque, gants, lunettes) lors de l'utilisation de produits chimiques
- stockage de ces produits hors de portée des enfants
- ne pas mélanger les produits chimiques
- diminution, voire arrêt, de la consommation de cigarettes
- éviter de fumer à l'intérieur
- laver les fruits et légumes avant consommation
- réduire la consommation de certains aliments (grillade, barbecue)
- préférer la pratique d'une activité physique en dehors des zones de forte pollution.

## REFERENCES

1. Kobilka BK. G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta*. avr 2007;1768(4):794-807.
2. Hill SJ. G-protein-coupled receptors: past, present and future. *Br J Pharmacol*. janv 2006;147 Suppl 1:S27-37.
3. Jules GE, Pratap S, Ramesh A, Hood DB. In utero exposure to benzo(a)pyrene predisposes offspring to cardiovascular dysfunction in later-life. *Toxicology*. 16 mai 2012;295(1-3):56-67.
4. Curfs DMJ, Knaapen AM, Pachen DMFA, Gijbels MJJ, Lutgens E, Smook MLF, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons induce an inflammatory atherosclerotic plaque phenotype irrespective of their DNA binding properties. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. août 2005;19(10):1290-2.
5. Knaapen AM, Curfs DM, Pachen DM, Gottschalk RW, de Winther MPJ, Daemen MJ, et al. The environmental carcinogen benzo[a]pyrene induces expression of monocyte-chemoattractant protein-1 in vascular tissue: a possible role in atherogenesis. *Mutat Res*. 1 août 2007;621(1-2):31-41.
6. Lecqueur V, Ferrec EL, N'diaye M, Vee ML, Gardyn C, Gilot D, et al. ERK-dependent induction of TNFalpha expression by the environmental contaminant benzo(a)pyrene in primary human macrophages. *FEBS Lett*. 28 mars 2005;579(9):1904-10.

7. N'Diaye M, Le Ferrec E, Lagadic-Gossmann D, Corre S, Gilot D, Lecureur V, et al. Aryl hydrocarbon receptor- and calcium-dependent induction of the chemokine CCL1 by the environmental contaminant benzo[a]pyrene. *J Biol Chem.* 21 juill 2006;281(29):19906-15.
8. Nukaya M, Walisser JA, Moran SM, Kennedy GD, Bradfield CA. Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in hepatocytes is required for aryl hydrocarbon receptor-mediated adaptive and toxic responses in liver. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol.* déc 2010;118(2):554-63.
9. Mayati A, Levoine N, Paris H, N'Diaye M, Courtois A, Uriac P, et al. Induction of intracellular calcium concentration by environmental benzo(a)pyrene involves a  $\beta$ 2-adrenergic receptor/adenylyl cyclase/Epac-1/inositol 1,4,5-trisphosphate pathway in endothelial cells. *J Biol Chem.* 3 févr 2012;287(6):4041-52.
10. Irigaray P, Ogier V, Jacquenet S, Notet V, Sibille P, Méjean L, et al. 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.* avr 2006;273(7):1362-72.
11. Laustiola KE, Lassila R, Kaprio J, Koskenvuo M. Decreased beta-adrenergic receptor density and catecholamine response in male cigarette smokers. A study of monozygotic twin pairs discordant for smoking. *Circulation.* nov 1988;78(5 Pt 1):1234-40.
12. Laustiola KE, Kotamäki M, Lassila R, Kallioniemi OP, Manninen V. Cigarette smoking alters sympathoadrenal regulation by decreasing the density of beta 2-adrenoceptors. A study of monitored smoking cessation. *J Cardiovasc Pharmacol.* juin 1991;17(6):923-8.
13. Larue D, Kato G. Reduced number of alpha- and beta-adrenergic receptors in the myocardium of rats exposed to tobacco smoke. *Eur J Pharmacol.* 9 avr 1981;70(4):519-29.
14. Factor P, Akhmedov AT, McDonald JD, Qu A, Wu J, Jiang H, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons impair function of  $\beta$ 2-adrenergic receptors in airway epithelial and smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* nov 2011;45(5):1045-9.
15. Monopoli A, Conti A, Forlani A, Ongini E. Beta 1 and beta 2 adrenoceptors are involved in mediating vasodilation in the human coronary artery. *Pharmacol Res.* avr 1993;27(3):273-9.
16. Arinze IJ, Kawai Y. Adrenergic regulation of glycogenolysis in isolated guinea-pig hepatocytes: evidence that beta 2-receptors mediate catecholamine stimulation of glycogenolysis. *Arch Biochem Biophys.* août 1983;225(1):196-202.
17. Kawai Y, Arinze IJ. beta-Adrenergic receptors in rabbit liver plasma membranes. Predominance of beta 2-receptors and mediation of adrenergic regulation of hepatic glycogenolysis. *J Biol Chem.* 10 avr 1983;258(7):4364-71.

18. Carron J, Morel C, Blum JW, Hammon HM. Effects of dexamethasone and colostrum feeding on mRNA levels and binding capacities of beta-adrenergic receptors in the liver of neonatal calves. *Domest Anim Endocrinol.* avr 2005;28(3):257-71.
19. Tekpli X, Rissel M, Huc L, Catheline D, Sergent O, Rioux V, et al. Membrane remodeling, an early event in benzo[a]pyrene-induced apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 15 févr 2010;243(1):68-76.
20. Dendelé B, Tekpli X, Hardonnière K, Holme JA, Debure L, Catheline D, et al. Protective action of n-3 fatty acids on benzo[a]pyrene-induced apoptosis through the plasma membrane remodeling-dependent NHE1 pathway. *Chem Biol Interact.* 25 janv 2014;207:41-51.
21. Jacob RF, Aleo MD, Self-Medlin Y, Doshna CM, Mason RP. 1,2-naphthoquinone stimulates lipid peroxidation and cholesterol domain formation in model membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* nov 2013;54(12):7189-97.
22. Sikkema J, de Bont JA, Poolman B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J Biol Chem.* 18 mars 1994;269(11):8022-8.
23. Bouskine A, Nebout M, Brücker-Davis F, Benahmed M, Fenichel P. Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor. *Environ Health Perspect.* juill 2009;117(7):1053-8.
24. Lahousse SA, Beall SA, Johnson KJ. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate rapidly increases celsr2 protein phosphorylation in HeLa cells via protein kinase C and casein kinase 1. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol.* mai 2006;91(1):255-64.
25. Bisset KM, Dhopeswarkar AS, Liao C, Nicholson RA. The G protein-coupled cannabinoid-1 (CB1) receptor of mammalian brain: inhibition by phthalate esters in vitro. *Neurochem Int.* oct 2011;59(5):706-13.
26. Mizuo K, Narita M, Yoshida T, Narita M, Suzuki T. Functional changes in dopamine D3 receptors by prenatal and neonatal exposure to an endocrine disruptor bisphenol-A in mice. *Addict Biol.* mars 2004;9(1):19-25.
27. Ishido M, Morita M, Oka S, Masuo Y. Alteration of gene expression of G protein-coupled receptors in endocrine disruptors-caused hyperactive rats. *Regul Pept.* 15 mars 2005;126(1-2):145-53.

**DÉSÉCHALLIERS Thomas – Rôle des récepteurs couplés aux protéines G adrénergiques dans la toxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques**

119 feuilles, 17 illustrations, 5 tableaux, 30 cm - Thèse : Pharmacie ; Rennes 1 ; 2016 ; N°

**Résumé**

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) sont des contaminants majeurs de l'environnement. Leur influence sur la santé humaine est importante ; ils présentent notamment un pouvoir cancérigène et une toxicité cardiovasculaire. La majorité de ces effets toxiques est liée à l'activation d'un récepteur cytosolique nommé récepteur aux hydrocarbures aromatiques (RAh). En outre, il est probable que les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), une famille de récepteurs transmembranaires contrôlant les principales fonctions de l'organisme, soient sous le contrôle des contaminants de l'environnement. Ainsi, il a été démontré que parmi les RCPG, le récepteur bêta2-adrénergique est une cible privilégiée des HAPs. L'objectif de cette thèse est d'établir un état des lieux du rôle de ces récepteurs bêta2-adrénergiques dans les mécanismes de toxicité liés aux HAPs.

**Abstract**

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) constitute a major family of widely-distributed environmental contaminants. They have a large influence on human health. Indeed, they have many toxic effects, such as carcinogenic properties and cardiovascular toxicity. Most of these effects are caused by the activation of a cytosolic receptor, called aryl hydrocarbon receptor (AhR). Besides, environmental contaminants are probably in contact with G protein-coupled receptors (GPCRs), a large family of transmembrane receptors that control many functions of the human body. Thus, studies have shown that among GPCRs, the beta2-adrenergic receptor is a PAHs likely target. The aim of this thesis is to review the beta2-adrenergic receptor roles in PAHs toxicity.

Rubrique de classement :

Mots-clés : contaminants environnementaux, hydrocarbures aromatiques polycycliques, benzo[a]pyrène, récepteurs couplés aux protéines G, récepteur bêta2-adrénergique, toxicité

Mots-clés anglais MeSH: environmental contaminants ; polycyclic aromatic hydrocarbons ; benzo[a]pyrene ; G protein coupled receptors ; beta-2 adrenergic receptor ; toxicity

Président : Monsieur LAGENTE Vincent

Assesseurs : Monsieur LE FERREC Eric [directeur de thèse]

JURY

Madame ALFARES Aude