

Pollution atmosphérique et diabète... Quel lien possible ? Une exposition expérimentale à l'ozone chez le rat induit une insulino-résistance périphérique

Ozone pollution and type II diabetes: an environmental link. Experimental exposure to ozone promotes insulin resistance in rats

Roxane E. VELLA

Alain GÉLOËN

Christophe O. SOULAGE

Université de Lyon, INSA-Lyon, INSERM U1060, CarMeN
Villeurbanne, France

Résumé

L'incidence des pathologies métaboliques, tel le diabète de type 2, a connu une importante progression au cours des dernières décades. Des études épidémiologiques récentes suggèrent que certains polluants atmosphériques pourraient jouer un rôle dans le développement et la progression de l'insulino-résistance, associée au diabète de type 2. L'ozone, un polluant photochimique majeur des zones urbaines, est associé à des concentrations augmentées de glucose et d'insuline plasmatiques à jeun ; cependant, de nombreux aspects de cette association restent à élucider. Des résultats récents obtenus dans notre laboratoire et publiés dans la revue américaine *Diabetes* (Vella et al., 2015) indiquent qu'une exposition expérimentale à l'ozone induit chez le rongeur de laboratoire un état d'insulino-résistance, prélude au développement d'un diabète de type 2. L'ozone étant trop réactif pour traverser la barrière alvéolo-capillaire, la toxicité systémique de l'ozone résulte de la production dans les poumons de médiateurs du stress oxydant et dont les effets délétères sur les tissus périphériques ont pu être démontrés. Ces travaux mettent en exergue un lien entre pollution et diabète et suggèrent le rôle de facteurs environnementaux dans l'étiologie de cette maladie pour l'heure essentiellement attribuée à des facteurs nutritionnels ou comportementaux.

Mots-clés

Ozone, insulino-résistance, stress oxydant, diabète de type 2.

Abstract

*A growing body of evidence suggests that exposure to traffic-related air pollution is a risk factor for type 2 diabetes. Ozone, a major photochemical pollutant in urban areas, is negatively associated with fasting glucose and insulin concentrations but many aspects of this association remain unclear. Recent data obtained in our laboratory and published in the journal *Diabetes* (Vella et al., 2015) indicate that an experimental exposure to ozone induced in laboratory rodent a state of insulin resistance, the first committed step towards type 2 diabetes. Using an environmentally realistic concentration (0.8 ppm), we demonstrated that short-term exposure of rats to ozone induced whole body insulin resistance, oxidative stress and disruption of insulin signalling in skeletal muscle. Pre-treatments with the antioxidant N-acetylcysteine alleviated insulin resistance, demonstrating that ozone triggered oxidative stress to impair insulin signaling in muscle. These studies highlight a link between pollution and diabetes and suggest the role of environmental factors in the etiology of this disease for the time being mainly attributed to nutritional or behavioral factors.*

Keywords

Ozone, insulin-resistance, oxidative stress, type-2 diabetes.

1. Contexte de l'étude : pollution atmosphérique et diabète

L'incidence des maladies chroniques telles que le diabète de type 2 (DT2), l'obésité, les maladies cardio-vasculaires, etc. a augmenté de façon exponentielle au cours des cinquante dernières années. Cette augmentation est bien sûr imputable au vieillissement et aux modifications du style de vie des populations, et notamment à l'augmentation de la sédentarité et à une alimentation toujours plus calorique. Pour autant, la progression de ces maladies est telle que les mauvaises habitudes alimentaires et comportementales ne suffisent pas à expliquer une telle augmentation de son incidence (Ford *et al.*, 2004). Bhatnagar (2009) a ainsi avancé que les facteurs environnementaux, associés ou non au style de vie, pouvaient être responsables de plus de 90 % des diabètes chez l'adulte. Par ailleurs, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) estimait en 2012 à 3,7 millions le nombre de décès prématurés causés dans le monde par la pollution de l'air extérieur. Si les liens entre pollution atmosphérique et maladies respiratoires et cardio-vasculaires sont désormais bien établis, de plus en plus d'études mettent en exergue ceux qui pourraient exister entre pollution atmosphérique et incidence du diabète. Brook *et al.* (2008) ont montré qu'il existe une association entre exposition au dioxyde d'azote et diabète chez les femmes dans certaines zones urbaines du Canada ; Kramer *et al.* (2010) font le même constat pour le dioxyde d'azote et les matières particulaires (PM) chez les femmes âgées en Allemagne ; Andersen *et al.* (2012) montrent même qu'une exposition sur le long terme à la pollution atmosphérique (dioxyde d'azote), peut contribuer au développement d'un diabète chez les sujets ayant un mode de vie sain, non-fumeurs et physiquement actifs ; Raaschou-Nielsen *et al.*

(2013) rapportent également une association entre pollution atmosphérique (dioxyde d'azote) et mortalité liée au diabète ; Malmqvist *et al.* (2013), enfin, montrent que l'exposition des femmes enceintes à certains polluants atmosphériques (les NOx) est associée à un diabète gestationnel et une pré-éclampsie, dans une région où la pollution est inférieure aux seuils d'alerte des directives actuelles sur la qualité de l'air.

Cependant, l'ensemble de ces études pointe du doigt exclusivement le rôle des PM et du dioxyde azote, tandis que le rôle des polluants photochimiques tels que l'ozone reste encore très mal défini. L'ozone est produit dans la troposphère par la réaction photochimique de composés issus d'émissions anthropogéniques, et contribue fortement au développement des maladies respiratoires et cardio-vasculaires. Les effets pulmonaires de l'ozone sont décrits depuis des dizaines d'années. Très récemment, des études ont évoqué un lien possible entre pollution à l'ozone et diabète ; une étude a mis en évidence qu'une exposition cumulée à l'ozone et aux sulfates pourrait prédisposer au développement d'un diabète de type I chez les enfants (Hathout *et al.* 2006). L'équipe de Dales *et al.* (2012) a montré un lien entre pollution atmosphérique (dont pollution à l'ozone) et augmentation du nombre d'hospitalisations dues aux complications liées au diabète. Kim et Hong (2012) ont fait le constat que la pollution à l'ozone pourrait augmenter le risque d'insulino-résistance chez les personnes âgées. Hoffmann *et al.* (2012) ont observé par ailleurs des effets de la pollution à l'ozone sur la pression artérielle chez les diabétiques de type 2.

Si ces études épidémiologiques ont mis en évidence une association entre pollution à l'ozone et diabète, la nature des mécanismes biologiques sous-tendant cette relation reste à définir. Notre travail, publié dans la revue officielle de l'*American Diabetes Association* (ADA) *Diabetes* (Vella *et al.*, 2015), a étudié de façon précise les mécanismes cellulaires et moléculaires qui pourraient lier pollution à l'ozone et diabète de type 2. Dans l'objectif de répondre à cette problématique, un modèle d'exposition à l'ozone chez le rongeur a été développé, afin de réaliser une étude *in vivo* et de mesurer l'impact de l'ozone sur le métabolisme glucidique et la sensibilité à l'insuline.

2. Un modèle expérimental d'exposition à l'ozone chez le rongeur

Les concentrations en ozone lors de pics de pollution atteignent, dans les villes les plus polluées du monde, la valeur de 0,18 ppm (soit 360 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), correspondant au seuil d'alerte de niveau 3 (Loomis *et al.* 1999 ; Meng *et al.* 2010). Une telle concentration d'ozone conduit à de nombreux problèmes respiratoires, et notamment aggrave les cas d'asthme, d'allergies et de broncho-pneumopathies chroniques obstructives (BPCO) (Medina-Ramón *et al.*, 2006 ; Takizawa, 2011; Moreno-Macías *et al.*, 2013). Nos expériences d'exposition à l'ozone sont conçues pour simuler chez le rat une exposition aiguë à l'ozone, représentative d'un pic de pollution. Le choix de la concentration d'ozone utilisée mérite quelques commentaires. Différentes études ont montré que les rats inhalent une fraction réduite d'ozone (40 à 47 %) présent dans l'air ambiant, par rapport aux humains (75 %, avec de larges variations interindividuelles) (Wiester *et al.* 1987 ; Wiester *et al.*, 1996). En conséquence, l'exposition à l'ozone observée chez le rat pour une concentration donnée **sous-estime fortement** les effets observés pour la même concentration chez l'homme. Il a été montré que les effets pulmonaires (essentiellement inflammatoires) observés chez l'homme sont comparables à ceux produits chez des rats exposés à des concentrations en ozone **cinq fois supérieures** (Hatch *et al.*, 1994). La concentration choisie dans la présente étude (0,8 ppm, soit 1 571 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) est donc réaliste pour simuler les valeurs de pollution à l'ozone observées en milieu urbain lors de pics de pollution. La situation la plus extrême rencontrée en France s'est présentée en 2003, lors de la canicule estivale. La région Provence-Alpes-Côte d'Azur a été la région la plus touchée, avec 78 jours de dépassement du seuil d'information (180 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) et 8 jours de dépassement du premier seuil d'alerte (240 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). Cette région a également enregistré la concentration maximale mesurée en 2003 avec 417 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$. À Mexico, la ville la plus polluée au monde, la population était encore récemment exposée très fréquemment à 0,12 ppm (Romieu *et al.* 1992 ; Romieu *et al.*, 1995). En outre, les rats ont été exposés à l'ozone pendant la

nuite, car la phase nocturne correspond à leur période d'activité, qui est inversée par rapport à celle de l'homme. Or les pics de pollution à l'ozone, fortement liés à l'indice UV et donc à l'ensoleillement, surviennent en journée, période physiologique active pour l'homme, qui sera en outre plus facilement en extérieur, et donc plus exposé.

Les rats ont été répartis aléatoirement en deux groupes : un groupe « témoin » et un groupe « ozone ». Les rats ont été placés dans 2 enceintes hermétiques en Plexiglas (L x l x h : 0,70 x 0,35 x 0,40 m, surface 0,25 m^2 , volume 0,1 m^3), alimentées par un débit d'air constant. Ils ont été exposés pendant la période nocturne (période d'activité du rat) à 0,8 ppm d'ozone (soit 1 571 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), ou de l'air filtré pour les rats « témoins ». L'ozone a été généré à l'aide d'une lampe UV, en faisant passer de l'air filtré sur une lampe ultraviolette. Un analyseur photométrique d'ozone (gamme : 0,001-2 ppm, ref. 41M, Environnement SA, Poissy, France) a permis d'ajuster la concentration à l'intérieur de l'enceinte en modulant le débit d'air à travers le système générateur d'ozone. La concentration moyenne d'ozone dans la chambre d'exposition était de $0,801 \pm 0,04$ ppm, tandis qu'elle restait inférieure à 0,001 ppm dans l'enceinte témoin.

3. Une exposition aiguë à l'ozone induit une insulino-résistance et la perturbation de la voie de signalisation de l'insuline dans le muscle squelettique

Les rats exposés à l'ozone présentent à jeun des concentrations en glucose et en insuline significativement augmentées (+23 % $p < 0,01$ et +128 % $p < 0,05$, respectivement) (tableau 1). En conséquence, l'index d'insulino-résistance HOMA-IR (*homeostasis model assessment of insulin resistance*) est significativement augmenté, au terme de 16 heures d'exposition à l'ozone à 0,8 ppm (+150 %, $p < 0,05$), suggérant le développement d'une insulino-résistance.

	Témoins (12)		Ozone (12)		Variation	p-value
Glycémie à jeun (mM)	4,3	± 0,3	5,3	± 0,2	+ 23 %	0,006*
Insulinémie à jeun (µU/mL)	11,5	± 3,2	26,1	± 4,2	+ 128 %	0,018*
Indice HOMA-IR	2,6	± 0,9	6,3	± 1,2	+149 %	0,016*

Tableau 1.

Effets d'une exposition aiguë à l'ozone (0,8 ppm, 16h) sur les paramètres plasmatiques métaboliques du rat.

Effect of short term exposure to ozone (0.8 ppm, 16 h) on plasma metabolic parameters.

Le clamp euglycémique hyperinsulinémique est la technique de référence pour mesurer la sensibilité périphérique à l'insuline. Il consiste à maintenir la glycémie à sa valeur de consigne (euglycémie, 6 mM), en dépit d'une perfusion continue d'insuline, par une perfusion ajustée de glucose. La production hépatique de glucose est ainsi inhibée par l'hyperinsulinémie imposée. La quantité de glucose perfusée (GIR pour *Glucose Infusion Rate*) est donc le reflet direct de la sensibilité des tissus périphériques à l'insuline. Le GIR mesuré lors du clamp est significativement diminué après une exposition à l'ozone par rapport à celui des rats témoins ($9,9 \pm 1,9$ contre $24,2 \pm 2,1$ mg.kg⁻¹.min⁻¹, n=5, p<0,01), confirmant le **développement de l'insulino-résistance** (figure 1A-B). La sécrétion de l'insuline a été mesurée chez les rats par un test de sécrétion à l'arginine. L'administration d'arginine « force » la sécrétion d'insuline par le pancréas. L'injection intraveineuse d'arginine induit chez les rats témoins, comme chez les rats exposés à l'ozone, une sécrétion d'insuline avérée par une élévation transitoire de l'insulinémie sans qu'une différence significative de l'aire sous la courbe (ASC) ne soit observée entre les 2 groupes (figure 1C). Ces données suggèrent que l'hyperglycémie observée

chez les rats exposés à l'ozone n'est pas due à un défaut de sécrétion d'insuline mais bel et bien au développement de l'insulino-résistance. Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de la résistance à l'insuline, nous avons étudié la voie de signalisation de l'insuline dans les principaux tissus cibles de l'hormone que sont le muscle, le tissu adipeux blanc et le foie. L'activation de la protéine PKB/Akt (Protéine Kinase B/Akt) par phosphorylation, en réponse à l'insuline, a été mesurée par la technique du *Western Blot* dans ces trois tissus. L'activation de PKB/Akt n'est pas affectée par une exposition à l'ozone dans le tissu adipeux et le foie (données non montrées). En revanche, la phosphorylation de la protéine PKB/Akt en réponse à l'insuline est significativement diminuée dans le muscle gastrocnémien des rats exposés à l'ozone (p<0,01, figure 1D).

Ces résultats démontrent une anomalie dans la régulation de l'équilibre glycémique, liée au développement d'une insulino-résistance musculaire (défaut d'action de l'insuline) sans que la capacité de sécrétion de l'insuline par le pancréas soit altérée.

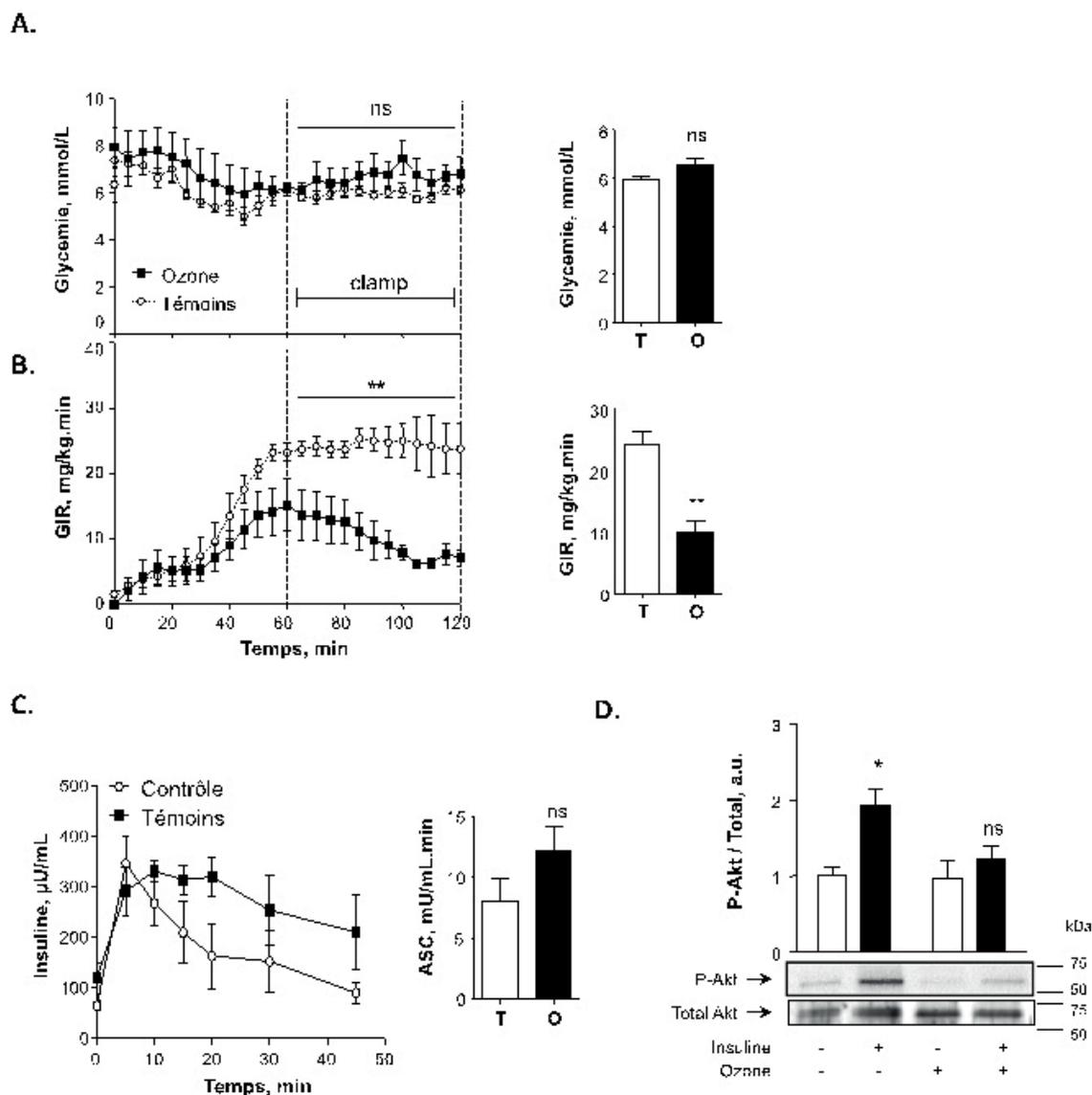


Figure 1.

Mesure de la sensibilité à l'insuline des rats exposés à l'ozone, par la technique du clamp euglycémique hyperinsulinémique. La glycémie est maintenue à la valeur basale de 6 mmol/L par une perfusion de glucose, qui est ajustée toutes les 5 minutes. A) Évolution de la glycémie et B) Glycémie moyenne au cours de la deuxième heure de clamp (t60-t120). C) Évolution du débit de perfusion du glucose (ou GIR pour Glucose Infusion Rate) et D) GIR moyen au cours de la deuxième heure du clamp (t60-t120). Le GIR se définit comme la quantité de glucose perfusée durant la seconde heure du clamp nécessaire pour maintenir l'euglycémie (exprimé en mg.kg⁻¹min⁻¹). Tous les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM pour n =5, **p<0,01, différence significative entre les rats témoins et les rats exposés à l'ozone.

Exposure to O₃ induces insulin resistance and disruption of insulin signaling pathways in skeletal muscle. Rats were exposed to clean air or ozone (0.8 ppm, 16h) and insulin sensitivity was measured using euglycemic hyperinsulinic clamps in fasting rats. Blood glucose was clamped at 6 mmol/L. Mean glycemia was measured (A) and mean glucose infusion rate (GIR) was calculated (B) as the glucose perfused during the second hour of the clamp required to maintain euglycaemia (mg.kg⁻¹min⁻¹). (C) Plasma insulin concentration was measured after intravenous administration of a non-glucose insulin secretagogue (arginine, 1g.kg⁻¹, n=5). (D) Rats were stimulated with insulin (0.75 UI/kg ip) prior to sacrifice and insulin-induced phosphorylation of PKB/Akt was measured in gastrocnemius muscle. All results are mean ± SEM (n =5).

4. L'ozone induit la production dans les poumons de médiateurs toxiques

L'ozone étant une molécule trop réactive pour pénétrer profondément dans les tissus, passer la barrière alvéolo-capillaire et atteindre la circulation sanguine, il paraît vraisemblable que la production pulmonaire de médiateurs toxiques soit responsable de l'insulino-résistance observée chez les rats exposés à l'ozone. Des Lavages Broncho-Alvéolaires (LBA) ont ainsi été réalisés, afin d'étudier les marqueurs de stress oxydant et d'inflammation. Les rats exposés à l'ozone présentent une infiltration de cellules sanguines dans les poumons ($\times 15$, $p < 0,001$, figure 2A), due à une extravasation de polynucléaires neutrophiles, des lymphocytes et des monocytes (figure 2B). En outre, la perméabilité alvéolaire est augmentée, comme l'élévation de la concentration protéique dans les fluides de LBA des rats exposés à l'ozone ($\times 12$, $p < 0,01$, figure 2C) permet de l'observer. L'infiltration de cellules immunitaires et la perméabilité alvéolaire augmentées confirment que l'ozone est à l'origine d'une importante inflammation pulmonaire. Cependant, aucune cytokine inflammatoire n'est retrouvée dans les fluides de LBA, ni dans le plasma des rats exposés à l'ozone (données non montrées), suggérant une contribution mineure

de l'inflammation dans les effets métaboliques rapportés. L'ozone est un oxydant puissant et la plupart de ses effets toxiques sont médiés par des réactions radicalaires. En outre, la peroxydation lipidique, mesurée par le dosage des thio-barbituric acid reactive substances (TBARS, $\times 3$, $p < 0,001$, figure 2D) ou des aldéhydes lipidiques (figure 2E) est significativement augmentée dans les fluides des LBA des rats exposés à l'ozone. Le contenu en protéines carbonylées, qui correspondent à des modifications oxydatives des protéines suite à un stress oxydant, est également augmenté de façon significative dans les poumons ($\times 9$, $p < 0,001$, figure 2F), confirmant le développement d'un stress oxydant pulmonaire chez les rats exposés à l'ozone. De façon surprenante, le stress oxydant ne se limite pas aux poumons. L'exposition à l'ozone induit chez le rat une augmentation de nombreux marqueurs plasmatiques du stress oxydant (tableau 2), comme des produits de peroxydations lipidiques (2,5, 2,0 et 1,6 fois augmentés pour le 4-hydroxyhexénal, le 4-hydroxynonénal et le malondialdéhyde, respectivement, $p < 0,05$) ou les protéines carbonylées (+63 %, $p < 0,001$). En outre, le contenu en carbonyles est significativement augmenté dans le muscle gastrocnémien ($\times 3,3$, $p < 0,001$, figure 2F), tandis que le tissu adipeux blanc et le foie ne sont pas affectés. Ceci suggère que le stress oxydant atteint les tissus périphériques et pourrait contribuer aux effets métaboliques de l'ozone, avec un tropisme particulier pour le muscle.

	Témoins (12)		Ozone (12)		Variation	p-value
4-HNE (nM)	7	± 4	22	± 3	+ 198 %	0,038*
4-HHE (nM)	11	± 3	39	± 3	+ 244 %	0,021*
MDA (µM)	0,9	± 0,1	2,2	± 0,3	+ 163 %	0,008*

Les données sont présentées sous forme de moyennes \pm SEM. Les différences sont considérées comme significatives au seuil de $p < 0,05$. Abréviations: 4-HHE, 4-hydroxy-2-hexénal; 4-HNE, 4-hydroxy-2-nonénal; MDA, malondialdéhyde.

Data are mean \pm SEM. Differences were considered significant at the $p < 0.05$ level. Abbreviations : 4-HHE, 4-hydroxy-2-hexenal, 4-HNE, 4-hydroxy-2-nonenal, MDA, malondialdehyde.

Tableau 2.

Effets d'une exposition aiguë à l'ozone (0,8 ppm, 16h) sur les biomarqueurs plasmatiques du stress oxydant chez le rat.

Effect of short term exposure to ozone (0.8 ppm, 16 h) on plasma biomarkers of oxidative stress.

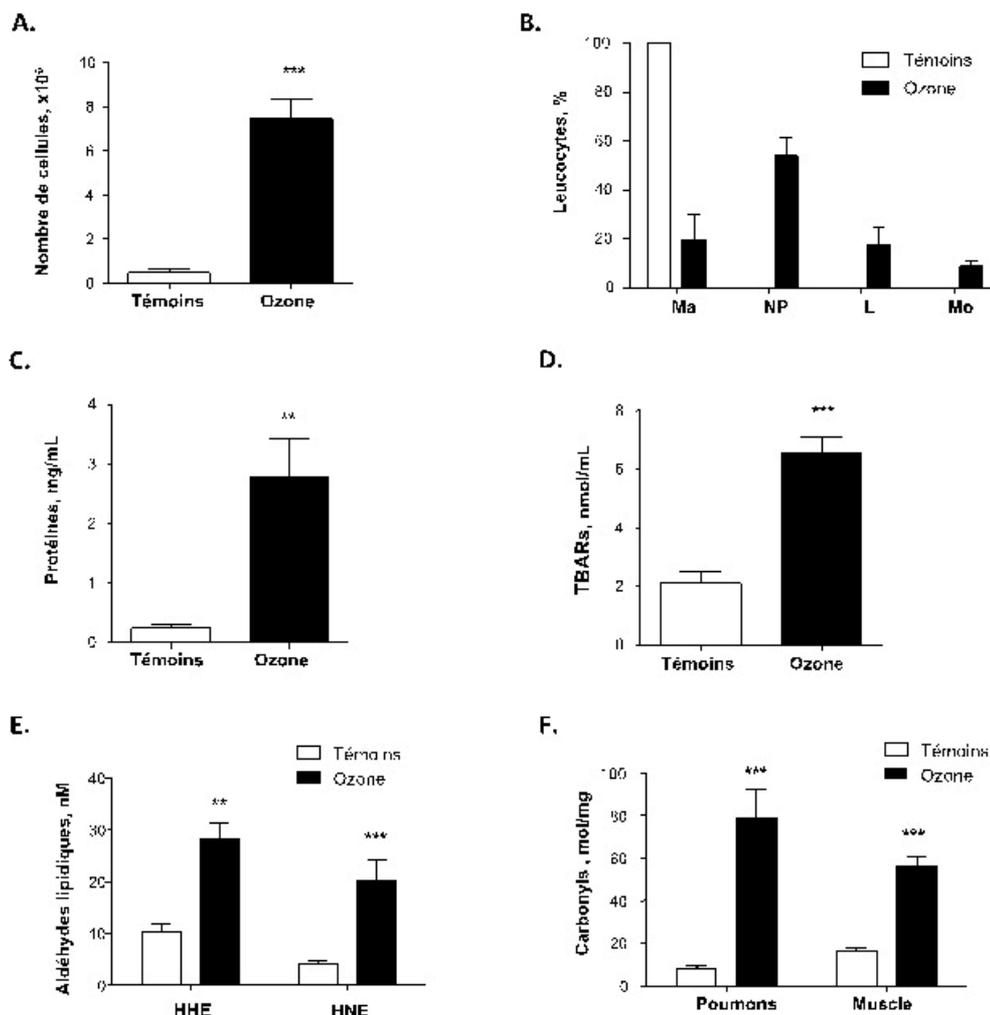


Figure 2.

Une exposition à l'ozone est à l'origine d'un stress oxydant et d'une inflammation pulmonaire. Les rats ont été anesthésiés après une exposition à l'ozone ou à l'air, afin de réaliser des lavages broncho-alvéolaires (LBA). A) Numération cellulaire totale dans les LBA. B) Formule leucocytaire des LBA (Ma = Macrophages ; PN = polynucléaires neutrophiles ; L = Lymphocytes ; Mo = Monocytes).

C) Concentration en protéines totales. D) concentration en thiobarbituric acid reactive species (TBARs). E) concentration en aldéhydes lipidiques (4-HHE, 4-hydroxy-2-hexenal, 4-HNE, 4-hydroxy-2-nonanal) dans les LBA. F) Concentration en protéines carbonylées dans le muscle et les poumons. Tous les résultats sont présentés sous forme de moyennes \pm SEM pour $n = 6-10$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,005$, différences significatives entre les rats exposés à l'air (blanc) et ceux exposés à l'ozone (noir).

*Ozone exposure triggers oxidative stress and inflammation in the lungs. Rats were anesthetized after clean air or O₃ exposure and catheters were placed in the trachea to collect BALF. (A) Total cell count. (B) Differential cell count using May-Grünwald Giemsa staining (Ma= Macrophages; NP= Neutrophil polynuclears; L= Lymphocytes; Mo= Monocytes). (C) Total protein concentration. (D) TBARs concentration quantified on supernatants. (E) The lipid aldehydes 4-hydroxy-2-nonanal (HNE) and 4-hydroxy-2-hexenal (HHE) were assayed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. (F) Protein carbonyl contents measured in lungs and gastrocnemius muscle. Results are mean \pm SEM for $n = 6-10$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$, significant differences between clean air (open bar) and ozone (solid bar) animals.*

5. Le stress oxydant est un déterminant majeur de l'insulino-résistance induite par l'ozone

L'ozone étant une espèce moléculaire très oxydante, le stress oxydant semble être un déterminant majeur de ses effets toxiques. Nous avons donc étudié la capacité d'un antioxydant, la *N*-acétylcystéine (NAC, 225 mg.kg⁻¹.jour⁻¹, 10 jours) à prévenir l'insulino-résistance induite par une exposition des rats à l'ozone. La sensibilité à l'insuline a été mesurée à l'issue de l'exposition à l'ozone en réalisant un test de tolérance à l'insuline. Ce test consiste à administrer aux animaux une dose calibrée d'insuline et à mesurer l'effet hypoglycémiant qu'elle produit. Ce test démontre que le prétraitement à la NAC (*N*-acétyl-cystéine) prévient le développement de l'insulino-résistance induite par l'exposition à l'ozone (figure 3A). En outre, le prétraitement à la NAC prévient contre la formation de carbonyles dans le poumon et le muscle des rats exposés à l'ozone (figure 3B), tout comme celle de TBARS dans les LBA (figure 3C). De façon intéressante, le prétraitement à la NAC ne prévient pas l'inflammation pulmonaire développée suite à une exposition à l'ozone, comme en témoigne l'élévation des protéines ($\times 9$, $p < 0,005$, figure 3D) et du nombre des cellules dans les LBA ($\times 15$, $p < 0,005$, figure 3E). Ceci suggère que les composantes inflammatoires des effets toxiques de l'ozone surviennent en amont du stress oxydant.

6. Discussion

6.1. Une exposition à l'ozone induit une insulino-résistance musculaire chez le rat

Le comportement alimentaire et la sédentarité sont les facteurs de risques les plus communs de risque cardio-métaboliques. Cependant, des observations récentes ont montré une forte association entre d'autres facteurs environnementaux, tels que la pollution (essentiellement la pollution atmosphérique liée au trafic automobile), et le diabète de type 2 (O'Neill *et al.*, 2007 ; Brook *et al.*, 2013 ; Raaschou-Nielsen *et al.*, 2013). Ainsi, l'exposition au NO₂ est associée à une prévalence accrue de

diabète chez la femme (Brook *et al.*, 2008) et le développement du diabète chez les individus en bonne santé (Andersen *et al.*, 2012). La pollution aux PM₁₀ est associée à l'incidence du diabète de type 2 chez les personnes âgées (Krämer *et al.*, 2010). Bien que de nombreux aspects de ces associations entre maladies métaboliques et pollution atmosphérique restent à élucider, ces observations sont d'une grande importance du fait des concentrations élevées des polluants aériens en milieu urbain, qui pourraient représenter un lien sous-estimé (mais critique...) entre l'industrialisation et l'incidence augmentée des maladies métaboliques (Basile et Bloch 2012 ; Liu *et al.*, 2013). L'ozone étant produit à partir d'autres polluants, il est le reflet d'un état de pollution atmosphérique avancé. C'est un polluant photochimique majeur, issu de la réaction sous l'effet des rayons UV entre des polluants organiques volatiles et des espèces réactives nitrogénées de type NO_x (NO, NO₂), émis durant la combustion des combustibles fossiles dans les gaz d'échappement des voitures et ceux des activités industrielles (Finlayson et Pitts, 1999). Tout comme les PM et le NO₂, l'ozone est associé à une glycémie et une insuliniémie à jeun élevées, et donc un index HOMA-IR, augmentés chez les personnes âgées (Kim et Hong, 2012). L'association de l'ozone avec ces paramètres est renforcée chez les sujets ayant des antécédents de diabète ou une susceptibilité particulière au stress oxydant, suggérant que l'ozone pourrait favoriser le développement du diabète.

Notre principale observation est qu'une exposition aiguë et réaliste à l'ozone induit *in vivo* une insulino-résistance périphérique, prémisses du développement du diabète de type 2. Les résultats obtenus excluent en outre toute perturbation de la sécrétion d'insuline, suggérant que l'intolérance au glucose observée chez les rats exposés à l'ozone est due à une résistance périphérique à l'insuline, plutôt qu'à un déficit dans sa sécrétion. La mesure de la phosphorylation de la protéine PKB/Akt en réponse à l'insuline dans le muscle squelettique confirme que l'ozone est à l'origine d'une altération des voies de signalisation intracellulaires de l'insuline dans ce tissu. De façon étonnante, seul le muscle squelettique est affecté, puisqu'aucune altération de la voie de signalisation n'a été observée dans le foie ou le tissu adipeux blanc. Ceci suggère un tropisme particulier du/des facteurs responsables des effets métaboliques de l'ozone pour le muscle. Le muscle squelettique est le tissu majeur, responsable chez les personnes

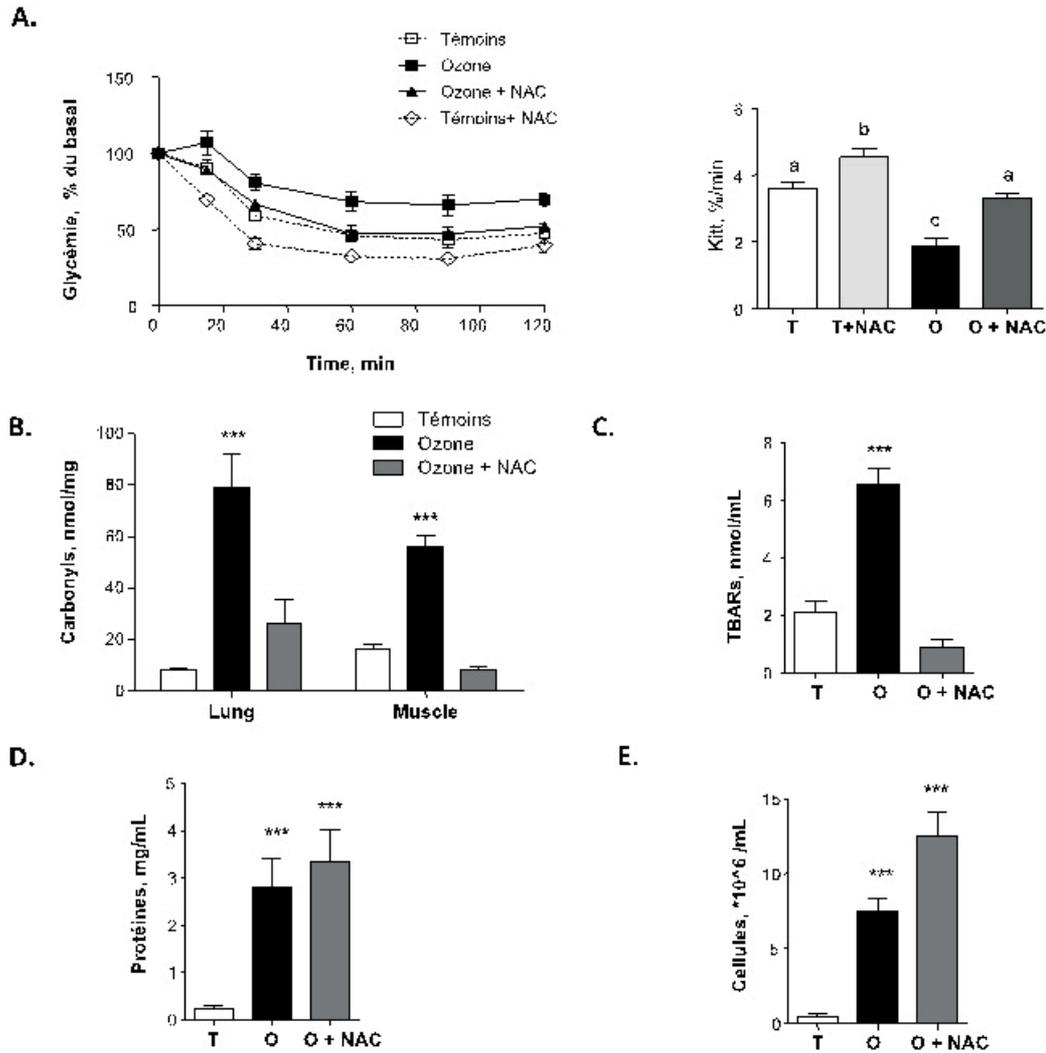


Figure 3.

La supplémentation en antioxydant (N-acétylcystéine ou NAC) prévient l'insulino-résistance induite par une exposition à l'ozone. Les rats ont été prétraités à la NAC (225 mg.kg⁻¹.jour⁻¹) pendant 10 jours, avant l'exposition à l'ozone. A) La sensibilité à l'insuline a été explorée par un test de tolérance à l'insuline. La glycémie a été mesurée, sur des rats à jeun, après une injection intrapéritonéale d'insuline (0,5 UI.kg⁻¹) et la constante de disparition du glucose plasmatique (KITT) pendant l'ITT a été calculée. B) Le contenu en carbonyles a été mesuré dans le poumon et le muscle gastrocnémien. Les LBA ont été réalisés chez les rats témoins et exposés à l'ozone, comme décrit précédemment. C) Les concentrations en TBARS D) et en protéines ont été déterminées, une numération cellulaire a été réalisée (E). Tous les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM pour n = 5 rats, ***P<0,005 différence significative entre les groupes.

*The antioxidant N-acetyl cysteine prevented ozone-induced disruption of insulin signaling pathways. Rats were given N-acetylcysteine (NAC, 225 mg.kg⁻¹) for 10 days prior to O₃ exposure. Insulin sensitivity was explored using insulin tolerance test. (A) Blood glucose concentration was measured after intraperitoneal injection of insulin (0.5 UI kg⁻¹) to fasting rat and plasmatic glucose disappearance rate (KITT) during the insulin tolerance test was calculated. Results are expressed as mean ± SEM for n = 5 rats, **p<0.01, ***p<0.005. Carbonyls content in muscle and lung (B); TBARS concentration (C), total protein concentration (D) and total cell count (E) in broncho-alveolar lavage fluid (n = 5) **p<0.01, ***p<0.005.*

non-obèses, du stockage du glucose stimulé par l'insuline et, en tant que tel, a été identifié comme crucial pour le développement de la résistance à l'insuline (DeFronzo *et al.*, 1981 ; DeFronzo *et al.*, 1985 ; Fröjdö *et al.*, 2009 ; Nolan *et al.*, 2011). L'insulino-résistance périphérique induite par une exposition à l'ozone peut donc être attribuée à un défaut unique de signalisation de l'insuline dans le muscle squelettique. Des expériences de récupération ont permis de mettre en évidence des effets métaboliques prolongés de l'ozone, après une exposition unique (0,8 ppm, 16h). Alors que l'inflammation et le stress oxydant pulmonaires se normalisent rapidement (en 24 à 48 h), la sensibilité systémique à l'insuline reste significativement diminuée jusqu'à trois jours après l'exposition (données non montrées).

L'ozone est trop réactif pour pénétrer profondément dans les tissus et atteindre la circulation sanguine (Pryor, 1992). L'ozone réagit avec les premières molécules rencontrées dans les voies aériennes ou les alvéoles pulmonaires (surfactant, hypophase, membrane plasmique des cellules de l'épithélium respiratoire). Ceci suggère donc que ses effets périphériques soient médiés par d'autres molécules, produits secondaires de réaction entre l'ozone et les structures pulmonaires, et dont la demi-vie est suffisante pour leur permettre de rejoindre la circulation générale et être véhiculées au sein de l'organisme. Nous avons observé que les rats exposés à l'ozone présentent une augmentation des aldéhydes lipidiques plasmatiques 4-HNE et 4-HHE (tableau 2), tout comme une augmentation du contenu en carbonyles dans le muscle squelettique. Le prétraitement avec l'antioxydant N-acétyl cystéine (NAC) prévient contre le stress oxydant systémique la carbonylation des protéines musculaires dans le muscle, ainsi que l'insulino-résistance (figure 3), suggérant fortement que les effets systémiques de l'ozone soient dus au stress oxydant.

6.2. Nature potentielle des médiateurs pulmonaires toxiques de l'ozone

Différentes études ont montré que l'ozone, très réactif, réagit immédiatement après sa pénétration dans les voies aériennes (Pryor, 1992), avec les molécules essentiellement lipidiques, du surfactant pulmonaire et/ou des membranes des cellules constituant l'épithélium pulmonaire. Sont alors produits, entre autre, des aldéhydes

lipidiques ou des produits lipidiques d'ozonation (LOPs pour *Lipid Ozonation Products*), qui sont fortement susceptibles d'initier des cascades physiopathologiques (Pryor *et al.*, 1995). Le surfactant pulmonaire et les membranes de cellules de l'épithélium pulmonaire sont majoritairement constitués de lipides (à 90 % et 40 %, respectivement). Les aldéhydes lipidiques et/ou les LOPs ont une réactivité plus faible et une demi-vie plus longue que l'ozone lui-même et pourraient médier ses effets au-delà de l'interface air/tissu. De façon intéressante, une inhibition partielle de la phosphorylation de PKB/Akt a pu être reproduite en incubant des cellules en culture avec des lavages broncho-alvéolaires (de rats contrôles) soumis à une ozonation *in vitro*. Il y a donc production de médiateurs toxiques par la seule ozonation du surfactant pulmonaire. Dans la mesure où ces facteurs sont certainement des produits d'oxydation/d'ozonation, ceci est en concordance avec des études précédemment menées, montrant que des LOPS tels que les séco-aldéhydes de cholestérol ont des effets nocifs, induisant l'apoptose de cardiomyocytes et de neurones (Sathishkumar *et al.*, 2005 ; Sathishkumar *et al.*, 2007). Notons cependant que l'expérience réalisée ici est biaisée, dans la mesure où seul le surfactant pulmonaire a été ozoné *in vitro*, alors que l'ozone réagit également très certainement avec les membranes des cellules épithéliales du poumon et qu'il active par ailleurs certaines cellules immunitaires présentes dans les poumons. En outre, les aldéhydes lipidiques (4-HHE, 4-HNE et MDA) sont significativement augmentés dans le plasma des rats exposés à l'ozone. Des publications de notre équipe et d'autres groupes ont montré que les aldéhydes lipidiques et le stress carbonyle sont capables d'induire une carbonylation des protéines et une insulino-résistance chez des souris, des cellules musculaires et des adipocytes (Demozay *et al.*, 2008 ; Pillon *et al.*, 2011 ; Pillon *et al.*, 2012). En outre, nous avons mis en évidence dans une autre étude le rôle essentiel du stress carbonyles dans la perte de sensibilité à l'insuline induite par le 4-HNE dans les cellules musculaires de souris (Pillon *et al.*, 2012).

6.3. Conclusion

Le diabète de type 2 est en plein essor, aussi bien dans les pays développés que dans les pays en voie de développement (van Dieren *et al.*, 2010), (www.who.int/fr). La pollution est également un enjeu majeur contre lequel les gouvernements doivent lutter ardemment. Les

liens entre pollution et diabète commencent tout juste à être mis en évidence (Andersen *et al.*, 2012 ; Raaschou-Nielsen *et al.*, 2012 ; Krämer *et al.*, 2010 ; Brook *et al.*, 2008). Alors que la pollution à l'ozone est devenue plus que préoccupante au cours de ces trente dernières années, peu de liens ont été jusqu'à ce jour établis entre celle-ci et le développement des maladies métaboliques, telles que le diabète de type 2 (Dales *et al.*, 2012 ; Hoffmann *et al.*, 2012 ; Kim et Hong, 2012). Notre étude montre que la pollution à l'ozone pourrait jouer un rôle causal dans le développement de l'insulino-résistance, et qu'une exposition réaliste, aiguë à l'ozone induit une insulino-résistance systémique

chez le rat. Ce phénotype alarmant est dû à la production de médiateurs pulmonaires toxiques, qui induisent un stress oxydant systémique et les activations subséquentes d'un stress dans le muscle squelettique, provoquant une perturbation de la signalisation de l'insuline provoquant elle-même une diminution de l'entrée du glucose dans les cellules. Nos résultats mettent en exergue que des facteurs non traditionnels, tels que la pollution atmosphérique, agit en synergie avec d'autres facteurs dominants (obésité, sédentarité), et accélère la progression de ce qu'il convient d'appeler l'épidémie de diabète de type 2.

Références

- Andersen ZJ, Raaschou-Nielsen O, Kettel M *et al.* (2012). Diabetes incidence and long-term exposure to air pollution: a cohort study. *Diabetes care*, n° 35(1), p. 92-98.
- Basile JN, Bloch MJ. (2012). Exposure to air pollution increases the incidence of hypertension and diabetes in black women living in Los Angeles. *Journal of clinical hypertension*, n° 14(11), p. 819-820.
- Bhatnagar A. (2009). Could dirty air cause diabetes? *Circulation*, n° 119 (4), p. 492-494.
- Brook RD, Jerrett M, Brook JR *et al.* (2008). The relationship between diabetes mellitus and traffic-related air pollution. *Journal of occupational and environmental medicine*, n° 50 (1), p. 32-38.
- Brook RD, Xu X, Bard RL *et al.* (2013). Reduced metabolic insulin sensitivity following sub-acute exposures to low levels of ambient fine particulate matter air pollution. *Science of The Total Environment*, n° 448, p. 66-71.
- Dales RE, Cakmak S, Vidal CB, Rubio MA. (2012). Air pollution and hospitalization for acute complications of diabetes in Chile. *Environment international*, n° 46, p. 1-5.
- DeFronzo RA, Ferrannini E, Sato Y *et al.* (1981). Synergistic Interaction between Exercise and Insulin on Peripheral Glucose Uptake. *The Journal of Clinical Investigation*, n° 68(6), p. 1468-1474.
- DeFronzo RA, Gunnarsson R, Björkman O *et al.* (1985). Effects of Insulin on Peripheral and Splanchnic Glucose Metabolism in Noninsulin-dependent (type II) Diabetes Mellitus. *The Journal of Clinical Investigation*, n° 76 (1), p. 149-155.
- Demozay D, Mas JC, Rocchi S, Van Obberghen E. (2008). FALDH reverses the deleterious action of oxidative stress induced by lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal on insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes*, n° 57(5), p. 1216-1226.
- Finlayson-Pitts BJ, Pitts JN. (1999). *Chemistry of the Upper and Lower Atmosphere: Theory, Experiments, and Applications*. Academic Press.
- Ford ES, Wayne HG, Mokdad AH. (2004). Increasing prevalence of the metabolic syndrome among US Adults. *Diabetes Care*, n° 27 (10), p. 2444-2449.
- Fröjdö S, Vidal H, Pirola L. (2009). Alterations of insulin signaling in type 2 diabetes: a review of the current evidence from humans. *Biochimica Et Biophysica Acta*, n° 1792 (2), p. 83-92.
- Hatch GE, Slade R, Harris LP *et al.* (1994). Ozone dose and effect in humans and rats. A comparison using oxygen-18 labeling and bronchoalveolar lavage. *American journal of respiratory and critical care medicine*, n° 150 (3), p. 676-683.
- Hathout EH, Beeson WL, Ischander M *et al.* (2006). Air pollution and type 1 diabetes in children. *Pediatric Diabetes*, n° 7 (2), p. 81-87.
- Hoffmann B, Luttmann-Gibson H, Cohen A *et al.* (2012). Opposing Effects of Particle Pollution, Ozone, and Ambient Temperature on Arterial Blood Pressure. *Environmental Health Perspectives*, n° 120 (2), p. 241-246.

- Kim JH, Hong YC. (2012). GSTM1, GSTT1, and GSTP1 Polymorphisms and Associations between Air Pollutants and Markers of Insulin Resistance in Elderly Koreans. *Environmental Health Perspectives*, n° 120 (10), p. 1378-1384.
- Krämer U, Herder C, Sugiri D *et al.* (2010). Traffic-related Air Pollution and Incident Type 2 Diabetes: Results from the SALIA Cohort Study. *Environmental Health Perspectives*, n° 118 (9), p. 1273-1279.
- Liu C, Ying Z, Harkema J *et al.* (2013). Epidemiological and Experimental Links between Air Pollution and Type 2 Diabetes. *Toxicologic Pathology*, n° 41(2), p. 361-373.
- Loomis D, Castillejos M, Gold DR *et al.* (1999). Air Pollution and Infant Mortality in Mexico City. *Epidemiology*, n° 10 (2), p. 118-123.
- Malmqvist E, Jakobsson K, Tinnerberg H *et al.* (2013). Gestational Diabetes and Preeclampsia in Association with Air Pollution at Levels below Current Air Quality Guidelines. *Environmental Health Perspectives*, n° 121 (4), p. 488-493.
- Medina-Ramón M, Zanobetti A, Schwartz J. (2006). The Effect of Ozone and PM10 on Hospital Admissions for Pneumonia and Chronic Obstructive Pulmonary Disease: a National Multicity Study. *American Journal of Epidemiology*, n° 163(6), p. 579-588.
- Meng YY, Rull RP, Wilhelm M *et al.* (2010). Outdoor Air Pollution and Uncontrolled Asthma in the San Joaquin Valley, California. *Journal of Epidemiology and Community Health*, n° 64(2), p. 142-147.
- Moreno-Macias H, Dockery DW, Schwartz J *et al.* (2013). Ozone exposure, vitamin C intake, and genetic susceptibility of asthmatic children in Mexico City a cohort study. *Respiratory research*, n° 14 (1), p. 14.
- Nolan CJ, Damm P, Prentki M. (2011). Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet*, n° 378 (9786), p. 169-181.
- O'Neill MS, Veves A, Sarnat JA *et al.* (2007). Air pollution and inflammation in type 2 diabetes: a mechanism for susceptibility. *Occupational and environmental medicine*, n° 64(6), p. 373-379.
- Pilon NJ, Croze ML, Vella RE *et al.* (2012). The lipid peroxidation by-product 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) induces insulin resistance in skeletal muscle through both carbonyl and oxidative stress. *Endocrinology*, n° 153(5), p. 2099-2111.
- Pilon NJ, Vella RE, Soulère L *et al.* (2011). Structural and functional changes in human insulin induced by the lipid peroxidation byproducts 4-hydroxy-2-nonenal and 4-hydroxy-2-hexenal. *Chemical Research in Toxicology*, n° 24(5), p. 752-762.
- Pryor WA. (1992). How Far Does Ozone Penetrate into the Pulmonary Air/tissue Boundary before It Reacts? *Free Radical Biology & Medicine*, n° 12 (1), p. 83-88.
- Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M. (1995). The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products. *Free Radical Biology & Medicine*, n° 19(6), p. 935-941.
- Raaschou-Nielsen O, Sørensen M, Kettel M *et al.* (2013). Long-term exposure to traffic-related air pollution and diabetes-associated mortality: a cohort study. *Diabetologia*, n° 56(1), p. 36-46.
- Romieu I, Lugo MC, Velasco SR *et al.* (1992). Air Pollution and School Absenteeism among Children in Mexico City. *American Journal of Epidemiology*, n° 136 (12), p. 1524-1531.
- Romieu I, Meneses F, Sienra-Monge JJ *et al.* (1995). Effects of Urban Air Pollutants on Emergency Visits for Childhood Asthma in Mexico City. *American Journal of Epidemiology*, n° 141 (6), p. 546-553.
- Sathishkumar K, Haque M, Perumal TE *et al.* (2005). A Major Ozonation Product of Cholesterol, 3beta-hydroxy-5-oxo-5,6-secocholestan-6-al, Induces Apoptosis in H9c2 Cardiomyoblasts. *FEBS Letters*, n° 579 (28), p. 6444-6450.
- Sathishkumar K, Xi X, Martin R, Uppu RM. (2007). Cholesterol Secoaldehyde, an Ozonation Product of Cholesterol, Induces Amyloid Aggregation and Apoptosis in Murine GT1-7 Hypothalamic Neurons. *Journal of Alzheimer's Disease*, n° 11 (3), p. 261-274.
- Takizawa H. (2011). Impact of Air Pollution on Allergic Diseases. *The Korean Journal of Internal Medicine*, n° 26 (3), p. 262-273.
- Van Dieren S, Beulens JW, van der Schouw YT *et al.* (2010). The global burden of diabetes and its complications: an emerging pandemic. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*, n° 17, p. S3-S8.
- Vella RE, Pilon NJ, Zarrouki B *et al.* (2015) Ozone exposure triggers insulin resistance through muscle c-Jun N-terminal kinase activation. *Diabetes*, n° 64(3), p. 1011-24.
- Wiester MJ, Stevens MA, Menache MG *et al.* (1996). Ozone uptake in healthy adult males during quiet breathing. *Fundamental and applied toxicology: official journal of the Society of Toxicology*, n° 29 (1), p. 102-109.
- Wiester MJ, Williams TB, King ME *et al.* (1987). Ozone uptake in awake Sprague-Dawley rats. *Toxicology and applied pharmacology*, n° 89 (3), p. 429-437.