

Présentation des bases moléculaires des voies de signalisation des dioxines

Mini-review : molecular signaling of dioxins

Thierry PINEAU, Pascal MARTIN et Cécile CALLEJA⁽¹⁾
(communication présentée le 27 novembre 2003)

RÉSUMÉ

Les congénères chimiques de la dioxine déterminent une toxicité considérable et polymorphe chez les rongeurs; son appréciation est plus délicate et confuse chez l'homme. De récents développements médiatiques rappellent que le risque d'exposition humaine est patent et que dans l'attente d'une connaissance plus approfondie des implications en biologie humaine, un légitime principe de précaution s'impose. Suivant une introduction de la problématique, une voie de signalisation moléculaire expliquant une majorité des effets toxiques des dioxines sera présentée. Elle implique deux protéines à domaine fonctionnel "PAS": un récepteur activé par les dioxines (AHR) et son partenaire de dimérisation (Arnt). Ce complexe nucléaire transactive une batterie de gènes qui constituent les cibles des dioxines. Cependant leur inventaire actuel n'autorise pas la compréhension exhaustive de la toxicité des dioxines. Des modèles murins déficients permettent d'appréhender certaines fonctions physiologiques et développementales de ce complexe activé par les dioxines. On observe un accroissement des connaissances relatives aux ligands naturels de ce récepteur (molécules alimentaires). De très récentes investigations mettent en lumière l'imbrication de la signalétique moléculaire du AHR avec celle du récepteur aux œstrogènes (ER), expliquant l'origine des surprenants effets œstrogéno-mimétiques produits par les contaminants environnementaux de la famille des dioxines.

Mots-clés : dioxines, récepteurs nucléaires, récepteur Ah, récepteur aux œstrogènes, toxicologie, signalisation moléculaire, souris.

(1) Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie, INRA, BP3, 31931 Toulouse Cedex 9. – Correspondance : tpineau@toulouse.inra.fr

SUMMARY

Dioxin derivatives sustain a substantial and versatile toxicity in rodent species, which remains challenging to investigate in human. As exemplified by several recent environmental contaminations reported by the media, humans remain under the threat of being accidentally exposed to dioxins. Firstly, we will describe a molecular signaling pathway that explains mainly the toxic effects of dioxins. It involves a pair of proteins that display a "PAS" active domain: the Aryl-hydrocarbon Receptor (AHR) and its dimerization partner (Arnt). This active dimer transactivates the transcription of a battery of target genes. Nevertheless, their identification does not provide evidence for all toxic actions attributed to dioxins. Transgenic murine models have provided novel physiological and developmental links to this receptor dimer, which appears to be recruited by several dietary chemicals. A recent investigation exposed the connection, at the protein level, between the AHR-dioxin pathway and the Estrogen Receptor pathway, thus providing a novel meaning to some puzzling estrogenic effects sustained by dioxin derivatives.

Key words: *dioxins, nuclear receptors, Ah receptor, estrogen receptor, toxicology, molecular signaling, mouse.*

« La Dioxine », appellation générique d'une famille chimique, retient cycliquement l'attention des médias, à la faveur de la découverte de contaminations environnementale et/ou alimentaire récurrentes. Dans le contexte d'une sensibilisation croissante des sociétés industrialisées à la sécurité sanitaire des aliments et à la préservation de l'environnement, les dioxines sont brandies souvent comme un épouvantail emblématique du risque chimique généré par les activités humaines. Ce traitement médiatique, ainsi que ses interprétations présentées par des groupes de pression aux intérêts antagonistes, s'écartent parfois de la rationalité et de l'objectivité pour céder à une dramatisation qui dessert la tenue d'un débat public éclairé et serein.

À la source de cet indéniable problème se trouvent les dioxines et furannes. Cet important groupe de substances polyhalogénées (dibenzo-p-dioxines et dibenzofurannes) existe dans l'environnement à l'état de traces générées par la combustion de composés organiques en présence principalement de chlore. Ce sont des mélanges de 210 congénères dont la toxicité a fondé la notoriété. L'accident industriel d'une usine de fabrication d'herbicides, survenu en 1976 à Seveso (Italie), a cristallisé l'attention et l'inquiétude publiques autour du modèle moléculaire de la famille: la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD). À des doses voisines du microgramme par kg, elle détermine chez certains animaux, comme le cobaye, une toxicité aiguë se manifestant par une importante perte de poids (jusqu'à 50 %), l'atteinte des fonctions de défense immunitaire et de reproduction et la mort de l'animal. L'effet de ces substances sur la santé humaine, à ces mêmes concentrations, pour être considérablement moins dramatique n'en est pas moins avéré. La survenue de chloracné est caractéristique de l'exposition humaine. Des données épidémiologiques acquises par l'étude de cohortes d'individus exposés, accidentellement ou professionnellement, indiquent des effets polymorphes et un faible accroissement d'incidence de cancers ou d'autres pathologies. Il est formellement établi que des expositions marquées conduisent à une perturbation de l'équilibre filles/garçons dans la descendance des hommes concernés. Plusieurs paramètres

compliquent la gestion du risque pour l'homme. Sous-produit de la combustion des ordures ménagères ou de carburants automobiles, les dioxines ont une diffusion très vaste. Leur longévité dans l'environnement est le corollaire de leur stabilité remarquable. La dioxine accumulée dans le tissu adipeux d'un organisme est éliminée très lentement (demi-vie de 7 ans chez l'homme), engendrant un risque toxique à long terme et un risque d'exposition des nourrissons lors de l'allaitement.

La connaissance des dioxines n'est pas exhaustive, mais plusieurs domaines d'investigation ont connu des avancées constructives:

- des perfectionnements analytiques améliorent la sensibilité de détection des dioxines et en réduisent les coûts, l'identification des sources et des conditions d'émission progressent et favorisent la politique de prévention conduite dans les pays industrialisés ;
- face à la diversité des molécules considérées qui possèdent chacune un potentiel toxique variable, s'ajoutant à la sensibilité différente des espèces animales (de 1 000 à 5 000 pour le TCDD), l'évaluation de l'impact toxique d'un mélange de congénères est délicate. Un système de facteurs d'équivalence toxique, encore imparfait, a été constitué dans ce but ;
- l'existence de facteurs modificateurs (hormonaux,...) des effets des dioxines a été établi ;
- de nombreux travaux ont mis en évidence la forte capacité inductrice de certaines dioxines vis-à-vis d'enzymes de biotransformation (cytochromes P450 hépatiques et pulmonaires) impliqués dans l'activation métabolique de procarcinogènes (hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) comme ceux issus de la fumée de tabac ;
- un récepteur cellulaire (récepteur Ah ou AHR) impliqué, au niveau nucléaire, dans le contrôle de l'action biologique et de la toxicité des dioxines a été identifié et abondamment étudié ;
- l'étude comparée de l'affinité relative de ce récepteur pour la dioxine (TCDD), chez différentes espèces animales, a révélé la moindre affinité du récepteur

humain comparé aux récepteurs de rongeurs ou de lagomorphe (facteur 10 à 20), relativisant la validité de l'extrapolation *ex abrupto*, chez l'homme, des observations toxiques chez l'animal ;

- une interconnexion vient d'être identifiée entre les voies de signalisation moléculaire des dioxines et celle des œstrogènes qui permet de comprendre des effets longtemps inexplicables des dioxines.

• Le récepteur Ah

Suivant la découverte par POLAND en 1976 du récepteur Ah (POLAND *et al.*, 1976), il fut progressivement établi une corrélation entre l'affinité d'un ligand pour AHR, l'induction d'enzymes hépatiques (cytochromes P450 [CYP1A]) et la sévérité de la toxicité aiguë (POLAND *et al.*, 1982). Ces résultats privilégient une fonction de « chef d'orchestre » de AHR dans le contrôle des effets toxiques des dioxines. Cependant on observe des discordances manifestes avec cette théorie généralement acceptée: 1) la molécule « 3-MC » (3-méthyl cholanthrène) administrée à la souris durant 20 jours produit un tableau pathologique différent de celui de la dioxine alors que leurs affinités respectives pour AHR sont semblables, 2) des paramètres pharmacologiques (capacité de liaison, affinité, liaison à l'ADN) des AHRs de hamster de rat et de cobaye sont d'ordres comparables mais la DL50, entre ces espèces, fluctue d'un facteur 5000, 3) les souches de rat Wistar H/W et Long Evans, respectivement résistantes et sensibles aux effets de la dioxine, présentent des récepteurs d'affinités comparables. Une étude génétique, conduite avec ces deux souches, conclut à l'implication additionnelle d'un ou deux gènes dans la médiation de la toxicité de la dioxine. En plus du rôle prépondérant d'AHR, l'implication de cofacteur(s) conjoint(s) est probable. Des actions supplémentaires de la dioxine, indépendantes de AHR, sont proposées: altérations de l'homéostasie de la vitamine A, des œstrogènes, de la peroxydation lipidique, atteinte du tissu adipeux brun, modulation d'expression de médiateurs de l'inflammation ou d'enzymes de l'homéostasie des glucides.

• Les facteurs transcriptionnels à domaine PAS: structure de AHR et Arnt.

La famille des protéines PAS

AHR constitue donc un déterminant essentiel de la médiation, à l'échelle moléculaire, de la toxicité des dioxines. Son ADNc, connu depuis 1992, révèle des domaines de forte homologie avec les protéines Per (Period) et Sim (Single-Minded) de *Drosophila melanogaster*. Ce motif "PAS" (PER-AHR-SIM), caractérise les membres d'une super-famille nouvelle de protéines incluant Arnt (AHR nuclear translocator), partenaire d'hétérodimérisation de AHR. Comme les récepteurs nucléaires, les protéines PAS sont actives dans le noyau des cellules, elles forment des dimères de protéines, se fixent à l'ADN et régulent la transcription de nombreux gènes cibles. Des originalités les en distinguent: présence des segments PAS et bHBH

(basique-Hélice/Boucle/Hélice), absence de doigt à atome de zinc, qui confèrent son originalité à la classe des récepteurs PAS. Plus de quarante membres sont identifiés dans des espèces variées (homme, lapin, rat, souris, truite, drosophile, *Cenorhabditis elegans*, l'ascomycète *Neurospora crassa* ou certaines algues). Ces protéines participent, dans les espèces peu complexes, à des fonctions ancestrales de différenciation cellulaire servant à l'organogenèse et à l'établissement des rythmes circadiens. Avec l'évolution, leurs implications ont gagné en complexité et certaines demeurent très imparfaitement connues.

Le domaine PAS, dans la phylogénie, apparaît associé à deux fonctions qui ont un lien évolutif: percevoir la lumière et appréhender le temps. Chez *Neurospora* et la drosophile, des protéines PAS gouvernent l'expression rythmique de gènes cibles. Le segment PAS de *white collar-2* (*Neurospora*) est à 45 % identique à une moitié d'un photorécepteur procaryote, PYP (photoactive yellow protein) et est similaire à un domaine répété des gènes de phytochromes végétaux (MESPHY). Considérant le rôle de ce motif peptidique dans la fonction de protéines d'horloge variées, son identification dans une diversité d'espèces est probable.

Les domaines fonctionnels

AHR et Arnt ont des architectures similaires. En région amino-terminale sont situés les motifs PAS et b-HBH. Ce dernier, commun à d'autres facteurs transcriptionnels (MyoD/E2A, Myc/Max, USF, E47...) reconnaît, sous forme dimérique et grâce au segment basique, des séquences nucléotidiques, boîtes E [5'-CANNTG-3']. Le fragment HBH assure une fonction d'interface entre les partenaires de dimérisation. L'hétérodimère AHR-Arnt identifie des séquences "XRE" (Xenobiotic Responsive Element) [5'-TNGCGTG(A/C)-3'] où le motif CGTG est crucial. En identifiant la demi-boîte E "GTG", Arnt s'y lie par le résidu T. AHR, doté de deux segments basiques (aa 9-20 et 27-39), interagit avec la région 5' du XRE qui diffère d'une boîte E. Les domaines HBH et PAS d'AHR et d'Arnt participent à la fixation à l'ADN et à la dimérisation. Le domaine PAS regroupe deux motifs imparfaitement répétés, PAS A et PAS B. Chez AHR, le segment C-terminal de PAS assure deux fonctions: la fixation du ligand et l'interaction avec la protéine chaperon hsp90. En position C-terminale d'AHR et d'Arnt un segment, riche en glutamine, gère la fonction de transactivation génique (JAIN *et al.*, 1994).

Le promoteur du gène d'AHR (11 exons) ne contient ni "TATA box" ni "CCAAT box". On y observe des sites de fixation du facteur Sp1, un site AP-1, une boîte E et un CRE (cAMP response element). Ils semblent impliqués dans l'expression tissulaire différentielle du récepteur, comparable chez le rat, la souris et l'homme. L'expression d'AHR, considérable dans le poumon, est modérée dans le foie et le rein et plus faible dans le cœur, la rate et le muscle squelettique. Arnt s'exprime à niveau constant dans ces tissus (Schmidt *et al.*, 1993).

• Les étapes de transduction du signal.

Activation de AHR, ligands et activateurs.

En plus des activateurs d'AHR déjà mentionnés, on peut citer certains flavonoïdes (benzo-naphto-flavone) ainsi que le 3-indole carbinol, présent dans les crucifères (choux, luzerne). Des molécules variées opèrent la transduction du signal sans être capables de déplacer le TCDD du récepteur: les benzimidazoles antiulcéreux inhibiteurs de la pompe à protons (oméprazole, lanzoprazole) ou anthelminthiques (thiabendazole), les oxo-caroténoïdes non provitaminiques A comme la canthaxanthine, utilisés comme additif alimentaire en pisciculture pour pigmenter la chair des salmonidés. Aucun ligand endogène d'AHR n'a été formellement identifié. Des produits de photo-oxydation cutanée (UV) du tryptophane constituent des candidats plausibles pour cette fonction.

La voie de signalisation, les cofacteurs

En absence de ligand, AHR est présent sous forme quiescente, complexé à hsp90, dans le cytosol. La protéine chaperon agit sur les segments b-HBH et PAS (site Se 191 aa) pour préserver la capacité d'interaction avec l'ADN, la fonctionnalité du site de fixation du ligand et la capacité d'hétérodimérisation avec Arnt. L'ancrage du ligand désunit AHR et hsp 90 (figure 1). À l'instar du complexe observé avec le récepteur aux glucocorticoïdes, AHR est aussi complexé à des protéines (figure 1). Ce sont des immuno-

philines, AIP (AhR-interacting protein) et ARA9 (Ah-receptor activated), XAP2 (Hepatitis B Virus X-associated protein 2) qui présentent une homologie avec les protéines FKBP d'interaction avec les immunomodulateurs FK506 et rapamicine. L'association d'AIP au complexe cytosolique serait labile. Le domaine de fixation du ligand d'AHR est rendu fonctionnel par phosphorylation d'un résidu tyrosine. Sous sa forme activée, AHR engage une hétérodimérisation nucléaire avec Arnt (ou Arnt2). En les phosphorylant, la protéine kinase C exerce un contrôle fonctionnel. Le complexe, suivant la reconnaissance spécifique d'un motif XRE, exerce une transactivation génique durant laquelle AHR coopère avec Sp1 et Arnt avec CBP/p300 et/ou Sp1, des facteurs de transcription (KOBAYASHI *et al.*, 1996) (figure 1).

• Signalisation via AHR : impact des phosphorylations

AHR et Arnt sont des phosphoprotéines. L'origine et les conséquences de ces modifications post-traductionnelles ont été particulièrement étudiées à partir de 1992. Du nombre conséquent de travaux publiés sur le sujet, on peut déduire un ensemble d'observations synthétiques et cohérentes qui identifient des sites primordiaux d'inter-relations entre "signalisation par AHR" et contrôle moléculaire des phosphorylations protéiques. En marge des résultats consensuels, subsiste un nombre appréciable de résultats produits en exemplaire unique ou controversés qui rend

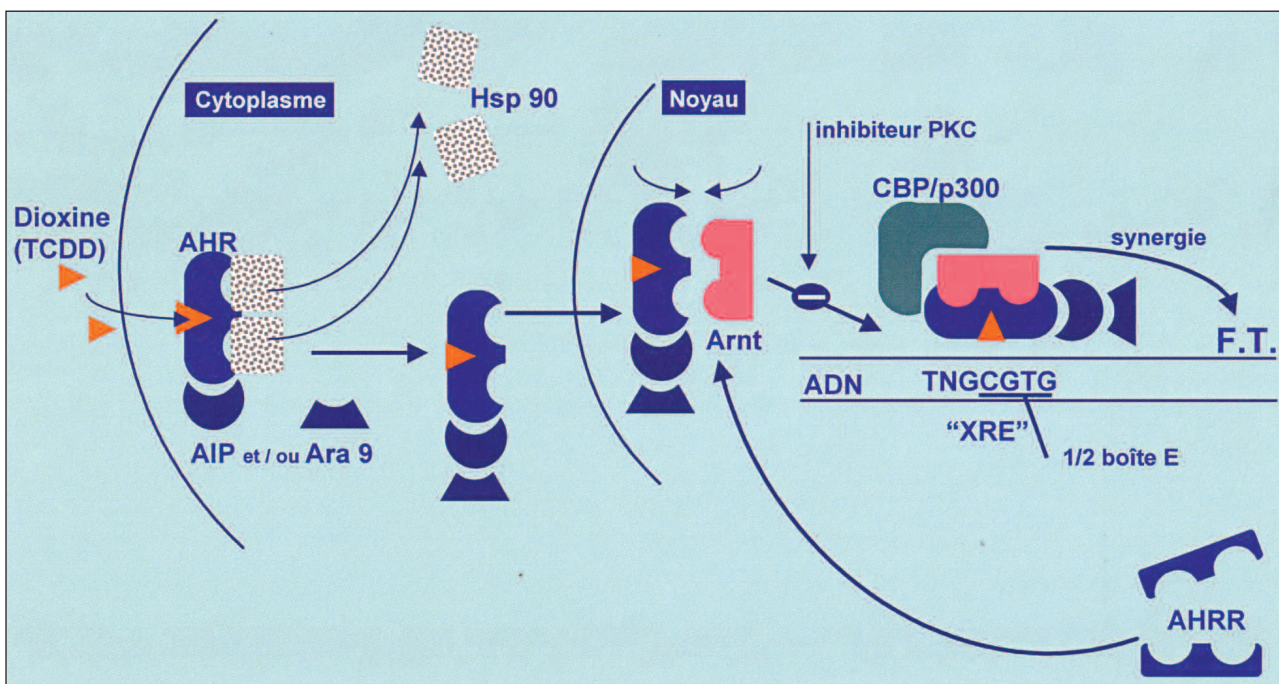


Figure 1 : Voie de signalisation moléculaire de la dioxine (TCDD).

Les étapes successives de cette voie sont : - la fixation de la dioxine au site actif du récepteur (AHR), dans le cytosol, - l'activation du récepteur, - son association à un partenaire spécifique de dimérisation (Arnt), - la reconnaissance, dans la région régulatrice de gènes cibles, de séquence nucléotidiques d'interaction (XRE), - la fixation à ces éléments et le recrutement de facteurs de transcription conduisant à la transactivation du gène et la production augmentée d'ARN messagers correspondants. Parmi les gènes régulés positivement par la dioxine, celui d'un répresseur (AHRR) permet la production d'une protéine qui s'oppose au fonctionnement normal de la voie de signalisation de la dioxine, créant ainsi une boucle de rétro-contrôle.

délicate la synthèse globale de la littérature sur le sujet. Ces discordances sont justifiées d'une part, par l'introduction progressive de sondes pharmaco-chimiques à l'efficacité et la spécificité croissantes (inhibiteurs et activateurs de kinases et de phosphorylases) et d'autre part, par l'usage de modèles cellulaires et *in vivo* variés. Pour ces raisons, de fréquentes discordances méthodologiques de détail compliquent ou rendent inappropriées des comparaisons d'études.

• Répresseur d'AHR

Une boucle de rétrocontrôle d'activation de AHR a été décrite en 1999 (MINURA *et al.*, 1999). Au plan moléculaire (figure 1), elle fait intervenir une protéine originale baptisée AHR-Repressor (AHRR) [2103 pb, 701 aa]. L'analyse de la séquence de son ADNc initialement isolé de l'intestin grêle murin, révèle que son plus haut degré d'identité est observé avec la zone des segments b-HLH et PAS-A de AHR. Le segment PAS-B, impliqué dans la fixation des ligands et l'interaction avec les protéines chaperons (Hsp90) est absent chez AHRR. La région carboxy-terminale d'AHRR diffère considérablement de celle d'AHR. On la considère généralement comme le siège de la fonction de transactivation génique. Localisé dans le noyau, le répresseur AHRR interagit spontanément avec Arnt, le partenaire usuel d'hétérodimérisation de AHR, d'une façon indépendante de la présence d'un ligand d'AHR dans l'environnement réactionnel. Logiquement, AHRR ne s'associe pas à Hsp90. Lors d'essais *in vitro* utilisant la séquence cible XRE, l'hétérodimère AHRR-Arnt n'a montré aucune capacité de modulation d'expression génique. En revanche, dans des conditions expérimentales comparables, AHRR est capable de réduire de manière dose-dépendante l'activation transcriptionnelle associée à l'activation d'AHR. Cette fonction de répression compétitive s'exercerait à deux niveaux : compétition entre AHR et AHRR pour le recrutement d'Arnt ainsi que compétition entre complexes AHR-Arnt et AHRR-Arnt pour la fixation aux sites XRE des gènes cibles. Cent cinquante acides aminés carboxyterminaux se révèlent cruciaux pour la fonction de répression d'AHRR. Deux sites XRE fonctionnels sont présents dans la région régulatrice 5' du gène d'AHRR. De ce fait, l'expression du répresseur est stimulée par toute activation d'AHR, définissant en conséquence une véritable boucle d'autorégulation négative de la voie moléculaire de signalisation de la dioxine. L'expression murine des messagers d'AHRR est faible dans tous les tissus examinés, mais son induction (3-méthylcholanthrène) est la plus marquée dans le cœur et dans le poumon, alors que dans le thymus, le foie le rein et l'intestin, elle est moins forte. Thymus et foie sont justement deux organes particulièrement sensibles aux effets délétères de la dioxine.

Ces travaux sont évocateurs d'un lien potentiel entre la susceptibilité spécifique d'un organe à la dioxine et son niveau d'expression locale d'AHRR. Cette hypothèse

devrait faire l'objet d'investigations plus poussées dans un futur proche. De surcroît, il sera très intéressant de connaître les degrés comparés d'expression constitutive d'AHRR entre différentes lignées de rongeurs, des primates non humains et l'homme dans une perspective d'étude de l'origine des différences inter-espèces de sensibilité à la dioxine. Ces travaux sont récents et pâtissent de sous-exploitation, cependant ils éclairent d'un jour nouveau des observations restées sans explication. Plusieurs équipes ont démontré que l'effet inducteur de CYP1A1, obtenu *in vitro* par les activateurs d'AHR, est exacerbé par l'exposition des cellules à un inhibiteur de la synthèse protéique (cycloheximide). L'origine de cette super-induction a été attribuée à un déficit de synthèse d'un répresseur naturel demeuré inconnu à cette date. L'identification d'AHRR apporte le lien moléculaire attendu qui permet l'harmonisation rationnelle théorique de toutes les données observées (DAUJAT *et al.*, 1996).

• Les gènes cibles d'AHR

On distingue la population des gènes dont la régulation par AHR est démontrée et ceux pour lesquels on a seulement observé la présence d'un ou plusieurs XRE en région régulatrice. Parmi les premiers, on retrouve de nombreux gènes hépatiques du métabolisme des xénobiotiques (phases I et II) [CYP1A1 -1A2 -1B1, NAD(P)H-ménadione oxydoréductase, UDP glucuronosyl transférase, glutathion transférase, aldéhydes deshydrogénases] ainsi que l'inhibiteur 2 de l'activateur du plasminogène, l'interleukine 1 β (IL1 β), le transforming growth factor (TGF α , β 2), le récepteur des œstrogènes et les protooncogènes c-jun et c-fos. On a identifié des séquences XRE, particulièrement chez la souris, dans de nombreux gènes de cytokines (IL-2 -3 -5 -6 -10, TGF β 1, interféron γ).

Notre connaissance des gènes cibles d'AHR concerne probablement une portion limitée de leur ensemble. Elle n'explique pas la totalité des manifestations toxiques observées, dont la compréhension nécessite l'identification de cibles par des approches transcriptomiques (puces à ADN).

• Pharmacogénétique d'AHR et Arnt chez le rongeur de laboratoire

La sensibilité inter-espèces à la dioxine est remarquablement contrastée comme le reflètent les DL50 observées chez le cochon d'Inde (1 μ g/kg), le hamster (1 000 μ g/kg) ou le rat Han Wistar (de 9 600 μ g/kg). Cependant, c'est au sein d'une même espèce que peuvent être conduites des études pertinentes pour disséquer les bases génétiques de la sensibilité à la dioxine. Le modèle animal historiquement le mieux documenté est la souris, cependant, les avancées les plus pertinentes dans ce domaine ont été réalisées ces dernières années en étudiant la pharmacogénétique du rat, relativement à sa sensibilité à la TCDD.

Il est établi que pour les lignées consanguines de souris C57BL/6 et DBA/2 la sensibilité à la dioxine (pour la

majeure partie des effets incluant la létalité) possède un support génétique : le locus Ah. La dose de TCDD nécessaire pour observer, chez la souris DBA/2, les manifestations toxiques obtenues chez la souris C57BL/6 est d'un ordre de 10 à 20 fois supérieur. Dans la souche DBA/2, deux paramètres concourent à la moindre sensibilité à la dioxine : AHR est exprimé plus faiblement et son affinité vis-à-vis de la TCDD est considérablement réduite. L'origine moléculaire de la différence de sensibilité à la dioxine des récepteurs des deux lignées est une transition d'acide aminé (Ala³⁷⁵ – Val), observée dans le domaine de fixation du ligand d'AHR de la souche DBA/2. Cette différence de sensibilité d'un facteur de 10 à 20 fois a été très utile dans la conduite d'études portant sur les différents congénères de PCDD et PCDF (EMA *et al.*, 1994).

Cependant, la découverte et la caractérisation d'un nouveau modèle animal de sensibilité différentielle à la dioxine semblent extrêmement prometteuses. Plusieurs études ont été conduites pour apprécier, selon des critères différents (létalité, manifestations toxiques, induction hépatique de CYP1A1), la sensibilité de diverses souches de rat. La synthèse de ces résultats révèle leur bon degré de cohérence : aux extrémités des différents classements se situent les souches "Long Evans" (LE) et "Han Wistar" (HW). Les premiers, (LE) avec une DL₅₀ de 10 µg/kg se révèlent pratiquement 1000 fois plus sensibles que les seconds (HW – DL₅₀ de 9 600 µg/kg) aux effets de toxicité aiguë de la TCDD. Outre le facteur de différence de sensibilité, le caractère remarquable du modèle réside dans la persistance, à des niveaux comparables dans les deux souches, d'une réponse d'induction hépatique du CYP1A et de certains autres effets biochimiques. L'évaluation comparée de ces modèles révèle une masse molaire (western blot) anormalement faible d'AHR chez le rat LE (98kDa / 106kDa) associée à une expression trois fois plus basse du partenaire de dimérisation Arnt. Une étude génétique, conduite par croisements itératifs et caractérisation phénotypique des souches LE et HW, a permis d'établir que la transmission de la résistance à la toxicité aiguë de la TCDD est de nature bi-allélique. La transmission homozygote de l'allèle "Ahr^{hw}" à une souche sensible, confère une totale absence de létalité jusqu'à une dose minimum de 2000 µg/kg de TCDD. Par ailleurs, un second gène ("B") a été détecté mais non caractérisé ; il est responsable de la transmission d'une résistance de moindre amplitude et semble impliqué dans le contrôle de l'élévation des taux circulants de bilirubine en réponse à l'administration de TCDD. Il est surprenant de constater que la distribution de ces allèles est sans effet sur la réponse inductive de CYP1A1. L'origine moléculaire de la taille réduite d'AHR dans la souche HW a été élucidée. Il s'agit d'une mutation ponctuelle du premier nucléotide de l'intron 10 qui engendre une modification d'épissage du messenger. La délétion peptidique qui en résulte affecte le segment C-terminal dans le domaine de transactivation. Une transition peptidique (Val497-Ala), dans une région variable de la protéine (exon 10) a également été détectée. En complément, une

étude conduite sur huit souches de rat les a classées en catégories faibles et forts répondeurs à la TCDD. Les forts répondeurs présentent une surexpression (X4) du messenger d'AHR. Il a été simultanément identifié dans toutes les souches l'existence conjointe deux messagers d'Arnt, dont l'un est tronqué (45 pb) dans le segment basique du domaine b-HLH. Les souches les plus sensibles à la dioxine sont celles qui expriment la plus forte proportion de messenger Arnt intègre. On observe donc que les travaux récents, conduits chez le rat, ouvrent de nouveaux horizons de recherche, applicables à l'homme, pour l'étude des bases moléculaires de la sensibilité à la dioxine.

• Rôle du récepteur AHR en physiopathologie

Les données de pharmacogénétique d'AHR chez le rongeur autorisent un doute légitime relatif à sa responsabilité dans la manifestation des effets toxiques de la dioxine. Deux questions sont déterminantes dans ce contexte. AHR contrôle-t-il toute ou partie de la toxicité de la dioxine ? Des voies de signalisation toxique, indépendantes du récepteur, peuvent être considérées. En association avec l'existence d'un ligand endogène, existe-t-il un rôle physiologique pour AHR ?

Premier modèle considéré : la drosophile. Ss "spineless-aristapedia", homologue d'AHR, exerce une fonction déterminante dans l'organogénèse (antenne et patte) et la régulation d'expression génique (bab : "bric a brac"). Un régulateur de l'expression de Ss a été identifié. C'est Dll ("Distal-less"), un déterminant majeur de différenciation des appendices de la face ventrale qui n'a pas d'homologue identifié dans une autre espèce.

Second modèle : la souris. L'application de la technologie d'inactivation génique en lignée murine transgénique par recombinaison homologue en cellule ES a permis des avancées considérables en physiologie et toxicologie d'AHR *in vivo*. Trois laboratoires ont travaillé en parallèle sur des projets de "gene knockout" d'AHR extrêmement voisins techniquement. Les fruits de leurs travaux ont été publiés en 1995, 1996 et 1997. Cet échelonnement des publications, en révélant graduellement aux équipes concurrentes les observations de leurs compétiteurs et en les contraignant à produire des résultats originaux et complémentaires, a permis d'optimiser l'exploitation de ces modèles animaux. Chacune de ces trois publications initiales est complémentaire des deux autres et de manière très intéressante, on observe un corpus de résultats concordants qui valident définitivement un nombre appréciable de fonctions d'AHR.

Il est utile de comparer les conditions expérimentales des trois projets. Les trois inactivations portent sur la région aminoterminal de la protéine, les cellules ES sont d'origine génétique 129SV dans les trois cas et le génotype a été transféré sur fond génétique C57BL/6 (FERNANDEZ-SALGUERO *et al.*, 1995 ; SCHMIDT *et al.*, 1996 ; MIMURA *et al.*, 1997). Ces concordances méthodologiques garantissent la justesse des comparaisons de résul-

tats opérées entre ces travaux. L'analyse comparée de ces trois phénotypes d'invalidation du gène AHR révèle plusieurs points de convergence. Le foie, qui présente une hypoplasie persistante (25 à 50 %) associée à une fibrose périportale, est une cible privilégiée de la déficience. Cette fibrose avait été initialement jugée contestable par certains experts, mais mentionnée dans les trois lignées invalidées, elle s'impose comme un signe constant qui résulte de la déficience. Dans un cas, une stéatose périnatale régressive est observée. La croissance pondérale est ralentie et la maturité sexuelle différée de quelques semaines. Un phénotype splénique est décrit dans deux cas mais les observations détaillées sont discordantes : hypocellularité avant six semaines dans un cas, hypercellularité après six semaines dans un autre. Dans les trois lignées déficientes, les animaux sont réfractaires à l'induction des messagers de gènes cibles (CYP1A, Ugt1*06, aldéhyde déhydrogénase) par la dioxine (TCDD), les hydrocarbures aromatiques polycycliques ou la canthaxantine. De surcroît, l'expression constitutive hépatique amoindrie de ces gènes, suggère l'absence d'effet d'un activateur endogène qui existerait constitutivement chez la souris. La dioxine (2 mg/kg) n'a plus de manifestations toxiques hépatique et splénique chez la souris déficiente. Ce modèle animal a permis à une équipe de disséquer l'origine cytologique des manifestations toxiques de la dioxine dans le foie. Selon les auteurs, l'expression parenchymateuse d'AHR (hépatocytaire) serait responsable des manifestations nécrotiques alors que son expression dans les cellules hématopoïétiques de l'organe serait responsable des manifestations inflammatoires du tableau clinique.

Des caractères phénotypiques divergents ont été notés. FERNANDEZ-SALGUERO *et al.*, (1995) relève une anomalie de l'histologie splénique, une diminution réversible du nombre des splénocytes (minimum vers 15-20 jours) ainsi que des hyperplasies et fibroses variées (cœur, estomac, rectum, peau) associées à des infections opportunistes, une mortalité considérable (40 % à 5 semaines). SCHMIDT *et al.*, (1996) sur fond génétique identique (C57BL/6J) observe la persistance d'une stéatose et une hématopoïèse hépatiques jusqu'à 3 semaines et fait état d'une viabilité préservée. Ce dernier point est particulièrement polémique. Les effets de l'invalidation d'AHR sur la viabilité de la souris ont été caractérisés de manière convaincante par une équipe spécialisée qui a utilisé la lignée de FERNANDEZ-SALGUERO *et al.*, (1995). La lignée déficiente générée par les travaux de SCHMIDT (distribuée par Jackson Laboratories, USA) nous semble également affligée de rendements de reproduction médiocres, contrairement aux indications initiales de cette équipe [observation rapportée par les auteurs].

Publiant la dernière, l'équipe de FUJII-KURIYAMA (MIMURA *et al.*, 1997) a centré ses efforts sur un aspect crucial des effets de la dioxine qui n'avait pas été considéré dans les deux premières études : le caractère tératogène de la TCDD. Des femelles gestantes, de type sauvage ou déficientes en AHR, ont été exposées à la dioxine (40 µg/kg

per os, 12,5 jours de gestation). L'examen des fœtus de type sauvage révèle la survenue de malformations du palais et du rein aux fréquences respectives de 100 et 91 %. Ces deux malformations n'apparaissent pas chez les fœtus déficients en AHR. Les auteurs établissent la nature indispensable d'AHR dans la manifestation des effets tératogènes de la dioxine chez la souris. On retiendra, de plus, que l'expérimentation conduite chez des souris hétérozygotes pour la mutation révèle une discordance d'incidence de survenue de fente palatine et d'hydronéphrose (respectivement 28 % et 89 %). Cette observation suggère que les modalités de l'implication d'AHR dans les effets tératogènes de la TCDD diffèrent suivant le tissu embryonnaire considéré : palais ou rein. En plaçant un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur d'AHR dans une lignée murine transgénique, il a été possible d'observer les sites embryonnaires d'expression d'AHR. En plus des expressions logiques dans les tissus non mésenchymateux du rein et dans les tissus du palais, une expression a été détectée au niveau des fentes branchiales, de la protubérance nasale et du maxillaire supérieur. Par une approche identique, on a également identifié une expression constitutive et une induction du gène rapporteur, au jour 13 de la gestation de la souris, au niveau des ébauches génitales. Il reste à documenter le rôle potentiel d'AHR sur ces dernières zones qui ne présentent pas de signature tératogène connue en réponse à une exposition à la dioxine.

La synergie d'action tératogène (fissure palatine) de l'acide rétinoïque et de la dioxine révèle une intéressante convergence de voies de signalisation. On sait que les rétinoides contrebalancent les effets carcinogéniques, *in vitro*, d'hydrocarbures polycycliques aromatiques et que les symptômes d'une exposition aux PCDFs ressemblent à ceux d'une déficience en vitamine A. Les souris déficientes en AHR ont une perturbation de l'homéostasie de l'acide rétinoïque dont la concentration hépatique est triplée (acide rétinoïque, rétinol, rétinyl palmitate). Simultanément on constate une diminution de 65 % du métabolisme de l'acide rétinoïque dans cette lignée. Cependant le niveau hépatique du cytochrome P450 RAI (4-hydroxylation de l'acide rétinoïque) n'est pas modifié chez ces animaux. On observe, en revanche, la diminution considérable du niveau de l'expression constitutive hépatique de CYP1A2 et de l'aldéhyde deshydrogénase ADH1/ADH2 (métabolisme du rétinaldéhyde). CYP1A2 n'est pas réputé participer à l'homéostasie des rétinoides. Les gènes de l'aldéhyde deshydrogénase n'étant pas induits directement par les activateurs d'AHR, il est suggéré que leur rétrocontrôle négatif interviendrait indirectement par une boucle d'autorégulation engagée par l'élévation locale de la concentration en acide rétinoïque. Un défaut, non élucidé, du métabolisme dégradatif de l'acide rétinoïque expliquerait ces taux élevés dont les conséquences biologiques concrètes (augmentation transglutaminaseII, transforming growth factor β) peuvent concourir à la survenue du tableau anatomopathologique hépatique observé pour la déficience en AH.

Les sites de fixation d'AHR, identifiés dans de nombreux promoteurs (récepteur aux œstrogènes, TGFβ, ...) suggèrent un rôle pivot de communication entre des voies de signalisation moléculaire variées pour produire les effets toxiques de la dioxine. Cependant il subsiste, pour des doses élevées de dioxine, une toxicité résiduelle indépendante de l'expression du récepteur qui n'est que succinctement décrite. À dose élevée de dioxine, on observe toujours chez la souris déficiente en AHR la survenue d'images apoptotiques hépatiques disséminées, modérément abondantes. Il serait intéressant de poursuivre les investigations afin de caractériser cette toxicité de la dioxine, à forte dose, qui emprunte une voie de signalisation indépendante d'AHR.

D'intéressantes observations, relatives à une fonction physiologique d'AHR, ont été réalisées en utilisant des lignées de fibroblastes embryonnaires murins spontanément immortalisés qui dérivent de la souche murine déficiente en AHR établie par Fernandez. Les fibroblastes déficients ont une sénescence plus précoce et une immortalisation considérablement différée. Ordinairement, la dioxine s'oppose à la différenciation adipocytaire hormono-induite de ces cellules. En absence d'AHR, l'effet n'est plus observé. Ce résultat place AHR en position déterminante dans le contrôle de l'expression préadipocytaire de PPARγ, la différenciation adipocytaire et le contrôle de l'arrêt du cycle cellulaire.

Un rôle du récepteur en physiologie cardiaque a été établi puisque les souris déficientes en récepteur présentent une hypertrophie cardiaque (cardiomyopathie + diminution du volume d'éjection). Son origine proposée est un accroissement de taille des cardiomyocytes qui est observé dès la gestation.

• Rôle de la protéine Arnt en physio-pathologie

Chez la drosophile, Tango (Tgo), une protéine orthologue de Arnt forme des hétérodimères avec les protéines Sim et Trh (Trachealess), connues pour contrôler respectivement l'embryogénèse du système nerveux central et celui du système respiratoire. Les mutations de Tgo produisent des effets représentant la somme des déficiences décrites pour les mutations de Sim et Thr.

Arnt (Arnt, Arnt2), partenaire d'hétérodimérisation de AHR, est un acteur déterminant de médiation de la toxicité de la dioxine. L'inactivation du seul gène Arnt conduit à un phénotype murin léthal à mi-gestation, sans caractéristique commune avec l'inactivation d'AHR qui oblitère sélectivement la voie de signalisation "AHR-Arnt". Dans les tissus en développement, l'hypoxie et l'hypoglycémie locales recruteront le facteur Arnt pour stimuler l'expression de facteurs angiogéniques (VEGF, tissue factor) ; la déficience en Arnt entraîne une vascularisation insuffisante du sac vitellin et de l'embryon. L'expression d'Arnt2 ne peut pallier la déficience en Arnt.

Les différences notables des phénotypes d'inactivation (drosophile / souris) suggèrent que le motif fonctionnel

b-HBH-PAS, bien que conservé dans la phylogénie, a acquis une variété de potentialités. Il convient donc d'observer une indispensable précaution dans l'établissement d'extrapolations fonctionnelles basées sur l'étude d'une protéine PAS dans des espèces différentes. Considérant les différences génétiques et fonctionnelles entre AHR murin et humain, il serait profitable d'introduire l'expression d'AHR humain sur un fond génétique murin déficient. Dans une espèce sensible, où les signes de toxicité de la dioxine sont patents, l'étude du comportement du récepteur humain serait enrichissante.

• Signalisations moléculaires croisées dioxines/œstrogènes

L'existence d'effets biologiques des dioxines impliquant la voie de signalisation du récepteur des œstrogènes n'a jamais été totalement écartée, bien qu'elle ne fût pas prouvée. En effet, les activateurs du récepteur Ah produisent paradoxalement des effets antiœstrogéniques et des effets œstrogénomimétiques dans des travaux conduits tant *in vivo* qu'*in vitro*, sur le récepteur de rongeur ou humain. Ce volet d'action œstrogénomimétique a été l'objet d'investigations basées sur l'hypothèse d'une implication du dimère activé AHR-Arnt dans la signalétique moléculaire du récepteur aux œstrogènes. De manière totalement inattendue, ce dialogue entre deux voies de signalisation vient d'être démontré et il ne met pas à profit le potentiel de modulation de la transcription génique du complexe AHR-Arnt. C'est l'existence d'une interaction directe « protéine-protéine » impliquant AHR, Arnt et ER qui vient d'être établie (OHTAKE *et al.*, 2003). Ainsi, dans un tissu comme l'utérus (figure 2), les activateurs d'AHR favorisent l'interaction d'« AHR-Arnt » avec les formes d'ERα ou β libres de ligand, conduisant ainsi à la formation d'une entité capable de : 1) reconnaître les éléments de réponse au récepteur ER situés dans les promoteurs

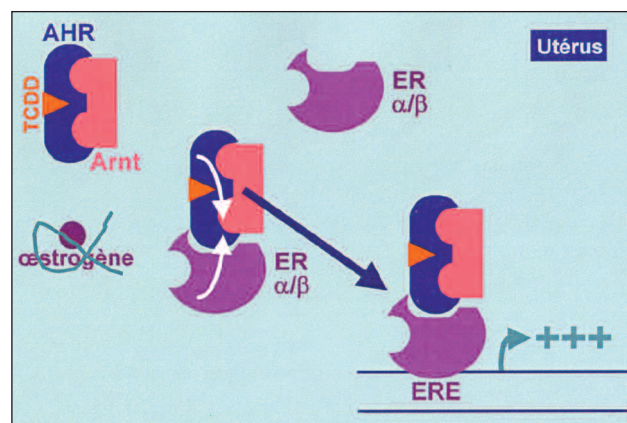


Figure 2 : Une démonstration originale : l'imbrication des voies de signalisation des dioxines et des œstrogènes (OHTAKE *et al.* 2003). Le récepteur à la dioxine (AHR) activé et couplé à son partenaire de dimérisation (Arnt) est capable d'entretenir une interaction physique avec le récepteur aux œstrogènes, en absence de ligand, conduisant à la formation d'une entité transcriptionnellement active sur des séquences nucléotidiques reconnues usuellement par le récepteur aux œstrogènes activé (ERE).

des gènes cibles des œstrogènes, 2) de s'y fixer et 3) d'y exercer une activité de promotion de la transcription. L'interaction physique protéine-protéine se situe entre le domaine A/B du récepteur ER (α ou β) et AHR (mais pas Arnt). En revanche, en présence de fortes concentrations en 17β -œstradiol, lorsque le récepteur ER est lié à son ligand et activé, les complexes actifs AHR-Arnt, en recrutant une fraction du récepteur ER minimiseraient les effets de l'œstrogène. Ainsi donc, en fonction de paramètres multiples (tissu, âge, cycle ovarien,...) l'activation de AHR peut conduire à la potentialisation du récepteur ER non activé ou à la répression de ce même récepteur activé. Cette récente démonstration réconcilie parfaitement les observations expérimentales antérieures faisant état d'effets apparemment contradictoires anti-œstrogéniques et œstrogénomimétiques des dioxines.

CONCLUSION

L'étude de la signalétique moléculaire des dioxines chez les vertébrés a fait de remarquables progrès,

expliquant étape après étape l'origine des multiples impacts toxiques des dioxines. Cependant, la variabilité observée de l'action biologique et de la toxicité des dioxines rend problématique la prévision des effets pharmacotoxicologiques de substances qui sont retrouvées en mélanges lorsqu'elles polluent l'environnement. Cette variabilité n'est pas simplement due au polymorphisme du récepteur AH selon les espèces, les individus et même les tissus. Elle dépend aussi de la distribution tissulaire des cibles et des cofacteurs de transcription, des cinétiques d'élimination des différents congénères présents dans les mélanges (contrôle de leur biodisponibilité) et encore de l'interférence d'autres facteurs comme les hormones sexuelles et même de l'effet des dioxines sur d'autres récepteurs (ER). On perçoit donc le relatif degré d'imperfection de notre connaissance des mécanismes qui conduisent à l'expression du potentiel toxique des dioxines. Il serait crucial de disposer de travaux permettant d'asseoir des règles fiables d'extrapolation à l'homme de données expérimentales acquises chez l'animal.

BIBLIOGRAPHIE

- DAUJAT M, CHARRASSE S, FABRE I, LESCA P, JOUNAIDI Y, LARROQUE C, POELLINGER L, MAUREL P (1996) Induction of CYP1A1 gene by benzimidazole derivatives during Caco-2 cell differentiation. Evidence for an arylhydrocarbon receptor-mediated mechanism. *Eur. J. Biochem.*, **237**, 642-652.
- EMA M, OHE N, SUZUKI M, MIMURA J, SOGAWA K, IKAWA S, FUJII-KURIYAMA Y (1994) Dioxin binding activities of polymorphic forms of mouse and human arylhydrocarbon receptors. *J. Biol. Chem.*, **269**, 27337-27343.
- FERNANDEZ-SALGUERO P, PINEAU T, HILBERT D, McPHAIL T, LEE S, KIMURA S, NEBERT D, RUDIKOFF S, WARD J, GONZALEZ FJ (1995) Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science*, **268**, 722-726.
- JAIN S, DOLWICK KM, SCHMIDT JV, BRADFIELD CA (1994) Potent transactivation domains of the Ah receptor and the Ah receptor nuclear translocator map to their carboxyl termini. *J. Biol. Chem.*, **269**, 31518-31524.
- KOBAYASHI A, SOGAWA K, FUJII-KURIYAMA Y (1996) Cooperative interaction between AhR, Arnt and Sp1 for the drug-inducible expression of CYP1A1 gene. *J. Biol. Chem.*, **271**, 12310-12316.
- MIMURA J, YAMASHITA K, NAKAMURA K, MORITA M, TAKAGI TN, NAKAO K, EMA M, SOGAWA K, YASUDA M, KATSUKI M, FUJII-KURIYAMA Y (1997) Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells*, **2**, 645-654.
- MIMURA J, EMA M, SOGAWA K, FUJII-KURIYAMA Y (1999) Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev.*, **13**, 20-25.
- OHTAKE F, TAKEYAMA K-I, MATSUMOTO T, KITAGAWA H, YAMAMOTO Y, NOHARA K, TOHYAMA C, KRUST A, MIMURA J, CHAMBON P, YANAGISAWA J, FUJII-KURIYAMA Y, KATO S (2003) Modulation of oestrogen receptor signaling by association with the activated dioxin receptor. *Nature*, **423**, 545-550.
- POLAND A, GLOVER E, KENDE AS (1976) Stereospecific high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J. Biol. Chem.*, **251**, 4936-4946.
- POLAND A, KNUTSON JC (1982) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **22**, 517-554.
- SCHMIDT JV, CARVER LA, BRADFIELD CA (1993) Molecular characterization of the murine Ah gene. Organization, promoter analysis, and chromosomal assignment. *J. Biol. Chem.*, **268**, 22203-22209.
- SCHMIDT JV, SU GH, REDDY JK, SIMON MC, BRADFIELD CA (1996) Characterization of a murine Ah null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **93**, 6731-6736.