

Toxicité de la dioxine : rôle des protéines PAS

**Pierre Lesca
Thierry Pineau**

La dioxine occasionne des risques avérés qui concernent la sécurité sanitaire des aliments et la santé publique. Un traitement médiatique considérable, souvent sans nuance, fait de ce contaminant un « ennemi public numéro 1 ». Certes, sa grande toxicité chez l'animal de laboratoire est établie ; cependant, les connaissances scientifiques actuelles n'autorisent pas l'extrapolation *ex abrupto* de cette toxicité à l'homme. Des données épidémiologiques et expérimentales suggèrent une moindre susceptibilité, à la dioxine, de l'homme comparé à la souris. Mais en l'absence de données incontestables relatives à l'homme, le débat et la polémique perdurent entre spécialistes. Dans ce contexte, il est délicat pour l'autorité administrative de définir les normes relatives à la présence de dioxine dans l'environnement ou les aliments, garantissant l'innocuité pour la population. Une meilleure compréhension du mode d'action toxique de la dioxine et de la spécificité de la sensibilité humaine permettraient de préciser et d'harmoniser les politiques publiques concernant ce contaminant. Dans cette attente, un légitime principe de précaution impose une tolérance minimale.

La « dioxine », appellation générique d'une famille chimique, retient régulièrement l'attention des médias, lors de la découverte de contaminations liées à l'environnement et/ou alimentaires. 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 engendré par les activités humaines. Ce traitement médiatique, ainsi que ses interprétations présentées par des

groupes de pression aux intérêts antagonistes, conduit à une dramatisation qui dessert la tenue d'un débat public éclairé et serein. Nous proposons une présentation synthétique de l'état des connaissances scientifiques relatives à la toxicité des dioxines et de leur voie moléculaire probable d'activité.

Les dioxines et les furannes constituent un important groupe de substances polyhalogénées (dibenzop-dioxines et dibenzofurannes) (*figure 1*) qui existent dans l'environnement à l'état de traces engendrées par la combustion de composés organiques en présence, principalement,

ADRESSE

P. Lesca, T. Pineau: Laboratoire de Pharmacologie, INRA, BP3, 31931 Toulouse Cedex 9, France.

E-mail: tpineau@toulouse.inra.fr

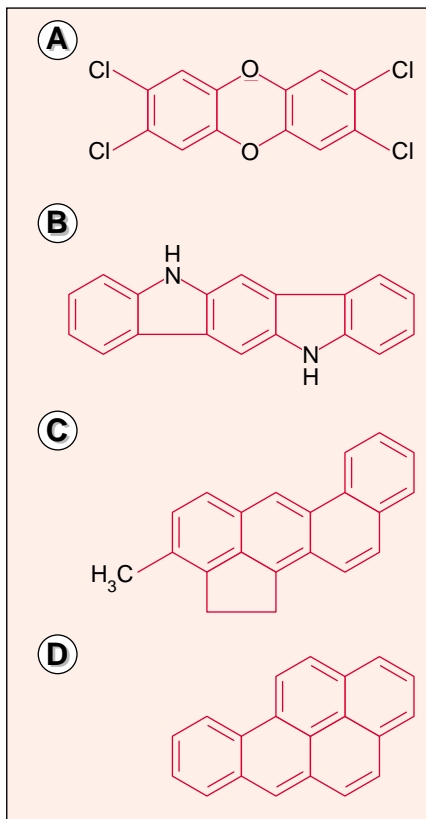


Figure 1. **Présentation de quatre ligands typiques du récepteur Ah (AHR).** A. dioxine: 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine. B. 3-méthylcholoranthrène. C. indolo[3,2-b]carbazole. D. bezo[a]pyrène. La planéité de la molécule et sa taille (environ 10 / 4 Å) sont deux caractéristiques structurales communes à ces activateurs de AHR.

de chlore. Ce sont des mélanges de 210 congénères (75 pour la famille des dioxines et 135 pour celle des furannes) 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) [1]. A 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. Quel est l'effet de ces substances sur la santé humaine? Le bilan de la contamination aérienne de Seveso, pour les populations humaines atteintes, se résume majoritairement à la survenue de manifestations cutanées réversibles (chloracné). Le paradoxe de cette apparente discordance des manifestations toxiques entre l'animal (exposition aiguë expérimentale) [2] et l'homme (exposition accidentelle) [3] suggère une différence de sensibilité entre espèces [4]. Néanmoins plusieurs paramètres aggravent le 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 remarquable stabilité. La dioxine accumulée dans un organisme est éliminée très lentement (demi-vie de 7 ans chez l'homme), engendrant un risque toxique à long terme. Pour ces raisons, l'évaluation spécifique de la sensibilité de l'espèce humaine aux dioxines constitue une priorité scientifique.

La connaissance des dioxines n'est pas exhaustive mais a progressé de façon notable dans plusieurs domaines :

- des perfectionnements analytiques ont amélioré la sensibilité de détection des dioxines, l'identification des sources et des conditions d'émission, favorisant 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 à 5000 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 [5] ;
- l'existence de facteurs modificateurs des effets des dioxines (hormonaux, etc.) a été établi ;
- la forte capacité inductrice de certaines dioxines vis-à-vis d'enzymes de biotransformation (cytochromes P450 hépatiques et pulmonaires) impliquées dans l'activation métabolique de pro-carcinogènes (hydrocarbures aromatiques polycycliques [HAP] comme ceux issus de la fumée de tabac) ont été mis en évidence [6] ;

- un récepteur cellulaire (récepteur Ah, *aryl hydrocarbon*) impliqué, au niveau nucléaire, dans le contrôle de l'action biologique et de la toxicité des dioxines a été identifié et abondamment étudié [7] ;

- 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 lagomorphes (facteur 10 à 20), relativisant la validité de l'extrapolation *ex abrupto*, chez l'homme, des observations toxiques chez l'animal [8].

En résumé, c'est cette notion de variabilité de l'action biologique et de la toxicité des dioxines qui rend si problématique toute prévision des effets pharmacotoxicologiques des mélanges de ces composés halogénés. 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 et des cinétiques d'élimination des différents congénères présents dans les mélanges et encore de l'interférence avec d'autres facteurs comme les hormones sexuelles et même de l'effet des dioxines sur d'autres récepteurs (récepteur de l'oestradiol) (figure 2). Dans ces conditions, on conçoit aisément avec quelle approximation ont été définis les facteurs d'équivalence toxique de chacun des 210 congénères de la dioxine.

Les sources

Les dioxines sont produites dans l'industrie à l'usage exclusif de la recherche scientifique. Cependant, elles constituent des sous-produits contaminants de nombreux processus industriels (cas de la production de l'herbicide « 2,4,5,T » et de l'antiseptique hexachlorophène, traitement des minerais de fer, blanchiment du papier par le chlore). Les incendies de forêt ou de transformateurs électriques à pyralène, la combustion des carburants (essence plombée, gazole) sont également une source de dioxines et de furannes. Sans traitement spécifique, les fumées issues de l'incinération des ordures ménagères constituent une source conséquente de rejet atmo-

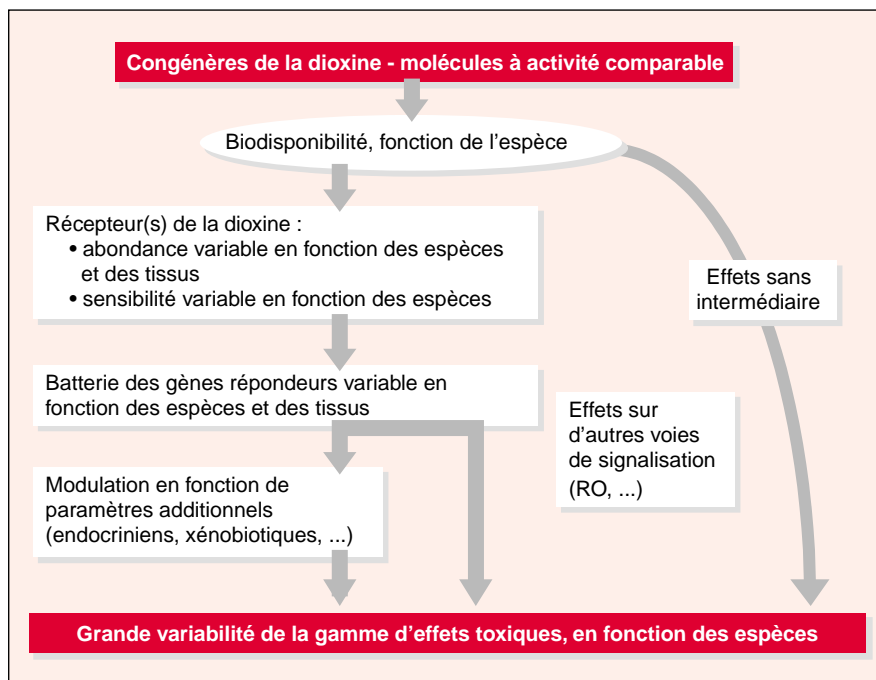


Figure 2. **Présentation des paramètres susceptibles de modifier l'effet des dioxines en fonction des espèces ou des organes considérés.** L'influence de ces paramètres sur la voie de signalisation moléculaire de la dioxine est présentée en détails dans le texte. RO: récepteur de l'œstradiol.

sphérique de dioxines puis de contamination de la chaîne alimentaire (herbe, animaux, produits d'origine animale) [2]. Les denrées de consommation courante (viande, poissons, lait, œufs) constituent la principale source (90 %) de dioxine pour l'homme. Les nouveau-nés nourris au sein ingèrent des quantités de dioxine proportionnellement plus grandes que les adultes en raison du caractère lipophile de la molécule et constituent un groupe plus particulièrement exposé. La dioxine, pratiquement insoluble dans l'eau, est inerte et remarquablement stable puisque seules des températures supérieures à 800 °C sont capables de la dégrader complètement.

La toxicologie de la dioxine : des caractéristiques originales

Parmi tous les xénobiotiques, la dioxine est remarquable à divers titres. Sa toxicité aiguë fluctue de l'extrême sensibilité du cobaye (dose

létale de 1 µg/kg) à la relative insensibilité des bactéries, plantes, mollusques et insectes jusqu'à l'innocuité pour une espèce de batraciens. Parmi son spectre d'action toxique [2], on peut citer: la létalité précédée d'un syndrome de dépérissement ainsi que l'altération des neurotransmissions cholinergiques ou sérotoninergiques et des fonctions immunitaires (involution thymique/immunosuppression), la dégradation de la fonction membranaire (fluidité diminuée, perméabilité accrue, transport ionique perturbé). La dioxine exercerait, en partie, sa toxicité cutanée et sur le développement, sa carcinogénicité et sa tératogénicité en altérant le fonctionnement de certains récepteurs (récepteur de l'EGF, *epidermal growth factor*). Diverses hypothèses comme l'impact sur la peroxydation des lipides, les stress oxydatifs et l'homéostasie de la vitamine A ont été évaluées, pour tenter d'expliquer la létalité aiguë de la dioxine mais aucune n'offrait de support expérimental suffisant et/ou s'accordait avec les divers modèles animaux étudiés [2].

Le défaut de corrélation entre toxicité *in vivo* chez les mammifères et effet sur leurs cellules en culture est remarquable (concentrations de 0,1 à 1 µM bien tolérées). En revanche, à des concentrations sans effet histopathologique notable, des lignées humaines et murines d'hépatomes présentent une induction des messagers de CYP1A1 à l'instar d'une exposition hépatocytaire *in vivo*. Ce paramètre a été retenu pour la définition des facteurs d'équivalence toxique des divers congénères de la dioxine et l'étude de la voie de signalisation conduisant à l'induction.

La biodisponibilité de la dioxine influence sa toxicité. L'absorption est appréciable par les voies orale, intrapéritonéale, transcutanée et percutanée, en privilégiant les solvants non aqueux. Lipoprotéines et chylomicrons permettent sa diffusion sanguine et lymphatique avec localisations hépatique et adipeuse préférentielles. Le volume des territoires adipeux chez l'homme offre un site de séquestration considérable constituant un facteur de pondération de la toxicité aiguë de la dioxine chez cette espèce. Un polymorphisme inter-espèces affecte le lent métabolisme de la dioxine. La toxicité est attribuée en majorité à la molécule native, les métabolites identifiés ne paraissant pas réactifs. La variabilité qui affecte ces paramètres module la biodisponibilité et le temps de demi-vie observés dans différentes espèces. La demi-vie, mesurée en jours chez les rongeurs et les lagomorphes (hamster: 11/15J, souris: 11/24J, rat: 16/31J, cobaye: 30/94J), est calculée en années chez les primates (singe: 1 an, homme: 7 ans). Cependant, l'influence avérée de ces différences de biodisponibilité n'explique pas, intégralement, les différences de susceptibilité à la dioxine entre espèces animales. Les différences physiologiques entre espèces (alimentation, hibernation...) s'y ajoutent; en revanche, elles ne peuvent être mises en cause pour rendre compte, dans une même espèce, de lignées consanguines sensible et insensible à la dioxine. C'est le cas des souches murines C57BL/6 et DBA/2, qui sont respectivement sensible et réfractaire à l'induction hépatique de CYP1A1 par le 3-méthylcholanthrène (3-MC). L'approche génétique de ces modèles

a permis d'établir qu'un caractère autosomique dominant transmis par le locus Ah gouverne un ensemble de paramètres de pathogénicité de la dioxine (léthalité, immunosuppression, atrophie thymique, myélosuppression, tératogénicité, porphyrie hépatique, etc.). et ont conduit à l'identification du gène du récepteur Ah (AHR), «récepteur de la dioxine», qui présente un polymorphisme du domaine «PAS» (voir ci-dessous) dans la souche DBA/2, responsable de la moindre affinité du récepteur Ah pour ses ligands [48]. Une différence d'un type comparable conférerait au récepteur humain une affinité modérée pour la dioxine, se traduisant par des effets toxiques moindres dans cette espèce [47].

Des lignées cellulaires isolées de ces différentes souches murines ont constitué des modèles de référence dans l'étude, *in vitro*, des effets pathogènes pré-cités ainsi que d'autres effets comme la modulation, par la dioxine, des taux de récepteur des œstrogènes ou de proto-oncogènes.

Le récepteur Ah

A la suite de la découverte par Poland en 1976 du récepteur Ah [9], une corrélation s'établit entre l'affinité d'un ligand pour AHR, l'induction des CYP1A hépatiques (paramètre modèle décrit ci-dessous) et la sévérité de la toxicité aiguë [10]. 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) le 3-MC administré à la souris durant 20 jours engendre 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 AHR de hamster de rat et de cobaye sont d'ordre comparable mais la DL50, entre ces espèces, varie d'un facteur 5 000; (3) les souches de rat *Wistar H/W* et *Long Evans*, respectivement résistantes et sensibles à la dioxine [11, 12], présentent des récepteurs d'affinités comparables. Une étude génétique, conduite avec ces deux souches, conclut à l'implica-

tion additionnelle d'un ou deux gènes dans la médiation de la toxicité de la dioxine. Outre le rôle prépondérant de AHR, l'implication de cofacteur(s) conjoint(s) est probable. La toxicité de la dioxine, à des doses élevées, chez l'animal déficient en récepteur suggère fortement des actions supplémentaires de la dioxine, indépendantes de AHR, qui demeurent imparfaitement élucidées: altérations de l'homéostasie de la vitamine A, des œstrogènes, de la peroxydation lipidique, atteinte du tissu adipeux brun, modulation d'expression du TNF (*tumor necrosis factor*) ou de PEPCK (phosphoénolpyruvate carboxykinase) [3].

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 superfamille 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, se dimérisent, se fixent à l'ADN et règlent la transcription (*m/s 1997, n°4, p. 459 et 961*). Elles s'en distinguent par la présence des segments PAS et bHLH (*basic-helix/loop/helix*), absence de doigt de zinc, qui confèrent son originalité à la classe des récepteurs PAS. Quarante-deux membres sont identifiés dans diverses espèces (homme, lapin, rat, souris, truite, drosophile, *Caenorhabditis 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 sont très imparfaitement connues.

Le domaine PAS, dans la phylogénie, paraît donc associé à deux fonctions qui ont un lien évolutif: percevoir la lumière et appréhender le temps. Chez *Neurospora crassa* et chez la drosophile, des protéines PAS gouvernent l'expression rythmique de gènes cibles. Le segment PAS de *white collar-2* (*Neurospora crassa*) a 45 % d'identité avec une moitié d'un photorécepteur procaryote, PYP (*photoactive yellow protein*), et est semblable 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 variété étendue d'espèces est probable [13].

Les domaines fonctionnels

AHR et Arnt ont des architectures semblables. Les motifs PAS et b-HLH qui sont situés dans la région aminoterminal (*figure 3*) sont communs à d'autres facteurs transcriptionnels (MyoD/E2A, Myc/Max, USF, E47...). b-HLH reconnaît, sous forme dimérique et grâce au segment basique, des séquences nucléotidiques, les boîtes E (5'-CANNTG-3'). Le fragment HLH 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') dans lesquelles le motif CGTG est fondamental. En identifiant la demi-boîte E «GTG», Arnt s'y lie par le résidu T. AHR, doté de deux segments basiques (acides aminés 9-20 et 27-39), interagit avec la région 5' du XRE qui diffère d'une boîte E [14]. Les domaines b-HLH 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 carboxy-terminal de PAS assure deux fonctions: la fixation du ligand et l'interaction avec la protéine chaperone hsp90. En position carboxy-terminale d'AHR et d'Arnt, un segment, riche en glutamine, gère la fonction de transactivation génique [15]. Le promoteur du gène d'AHR (11 exons) ne contient ni «boîte TATA» ni «boîte CCAAT», mais présente des sites de fixation du facteur Sp1, un site

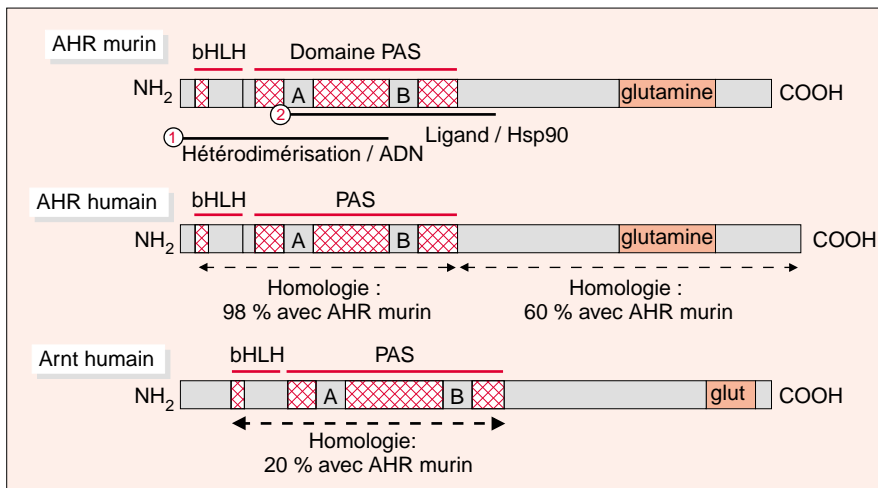


Figure 3. **Architecture des protéines à segment «PAS» (Per-AHR-Sim) impliquées dans la signalisation des dioxines: AHR et Arnt.** bHLH: domaine basique helix-loop-helix, glutamine: segment riche en glutamine de la région carboxy-terminale. 1. Segment impliqué dans l'hétérodimérisation de AHR et Arnt ainsi que dans l'interaction du complexe avec la molécule d'ADN via les domaines basiques. 2. Segment responsable de la fixation des ligands du récepteur et de son interaction stabilisatrice avec la protéine Hsp 90.

AP-1, une boîte E et un CRE (*cAMP responsive element*) qui semblent impliqués dans la régulation de la spécificité d'expression du récepteur [16], 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 des niveaux comparables dans ces tissus.

Les étapes de transmission du signal

Activation de AHR, ligands et activateurs

Outre les 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 transmission du signal sans être capables de déplacer le TCDD du récepteur: benzimidazoles anti-ulcéreux inhibiteurs de la pompe à protons (oméprazole, lanzoprazole) ou anthelminthiques (thiabendazole), oxo-caroténoïdes non provitaminiques A comme la canthaxanthine, utilisée comme additif alimentaire en pisciculture pour pigmenter la chair des salmonidés [17]. Ces molécules présentent des affinités modestes pour le récepteur; cepen-

dant, elles pourraient le mobiliser par l'entremise de phosphorylations catalysées par des protéine-kinases. 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 [18].

La voie de signalisation, les co-facteurs

En l'absence de ligand, AHR est présent sous forme quiescente, complexé à hsp90, dans le cytosol [19] (figure 4). La protéine chaperonne agit sur les segments b-HLH et PAS (site de 191 acides aminés) pour préserver la capacité d'interaction avec l'ADN, la fonctionnalité du site de fixation du ligand et la capacité d'hétérodimérisation avec Arnt [20, 21]. L'ancrage du ligand désunit AHR et hsp 90. AHR est aussi complexé à des protéines: immunophilines, AIP (*AhR-interacting protein*) et ARA9 (*Ah-receptor activated*) [22, 23], qui présentent une homologie avec les protéines FKBP d'interaction avec l'immunomodulateur FK506. 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 hétérodi-

mérisation nucléaire avec Arnt (ou Arnt2). En les phosphorylant, la protéine kinase C exerce un contrôle fonctionnel [24]. 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 [25, 26]. En 1999 a été identifiée, chez la souris, une protéine régulatrice de AHR (AHRR) [26 bis]. Dépourvue de segment PAS-B, elle interagit spontanément avec Arnt pour constituer un complexe sans activité transcriptionnelle. Dans les organes qui l'expriment (cœur, poumon, foie), AHRR entre en compétition avec AHR pour le recrutement de Arnt.

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, CYP1A2, CYP1B1, NAD(P)H-ménadione oxydoréductase, UDP glucuronosyl transférase, glutathion transférase, aldéhydes déshydrogénases) ainsi que l'inhibiteur 2 de l'activateur du plasminogène, l'interleukine 1 β (IL1 β), le TGF α , le TGF β 2 (*transforming growth factor α et β 2*), le récepteur des œstrogènes et les proto-oncogènes c-jun et c-fos. On a identifié des séquences XRE, en particulier chez la souris, dans de nombreux gènes de cytokines (IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-10, TGF β 1, interféron γ).

Notre connaissance des gènes cibles d'AHR concerne probablement une proportion limitée de leur ensemble. Elle n'explique pas la totalité des manifestations toxiques observées, dont la compréhension nécessite l'identification de cibles, par exemple en analysant le transcriptome par nanométrie dans une variété d'espèces et de tissus.

Rôle du récepteur AHR en physiopathologie

Deux questions sont déterminantes: AHR relaie-t-il tout ou partie de

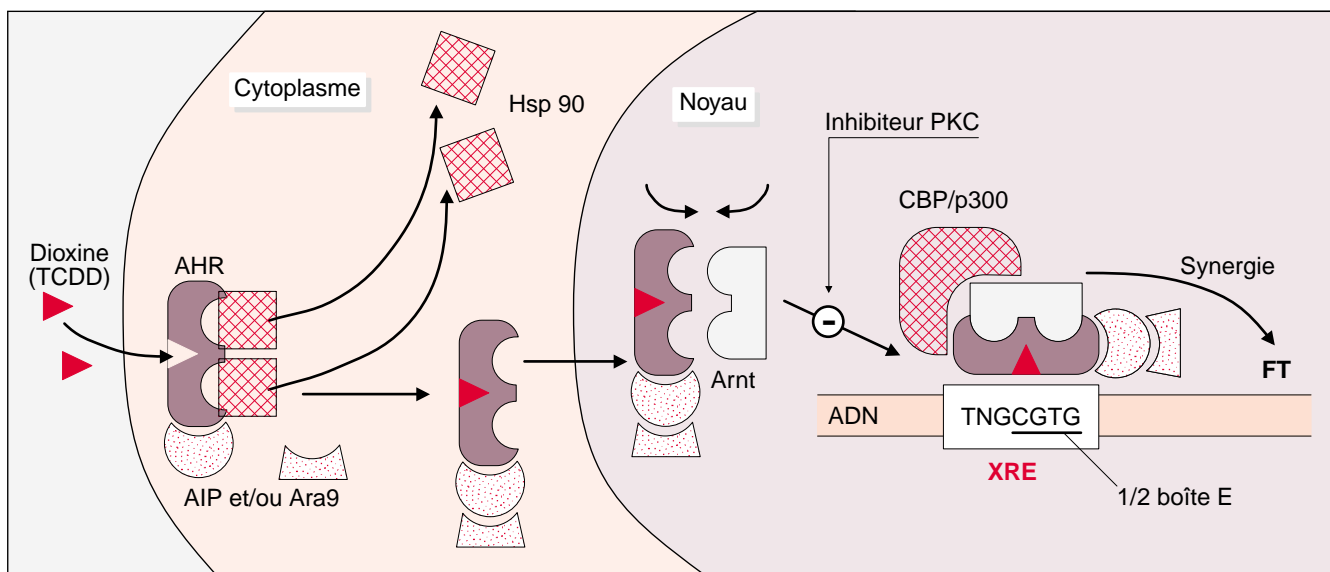


Figure 4. **Voie de signalisation moléculaire de la dioxine (exemple de l'action de la dioxine dans l'hépatocyte).** Le récepteur cytosolique, sans faculté de dimérisation, est complexé à la protéine Hsp 90 et des protéines de structure voisine des immunophilines (AIP ou ARA 9). La fixation du ligand déstabilise l'association à Hsp 90; AHR adopte une conformation permettant l'hétérodimérisation nucléaire avec le partenaire Arnt. Le complexe interagit avec l'ADN au niveau de sites reconnus XRE (xenobiotic responsive elements) et peut agir en synergie avec différents facteurs transcriptionnels. FT: facteurs transcriptionnels.

la toxicité de la dioxine? Existe-t-il un rôle physiologique pour AHR? Chez la drosophile, *Ss (spineless-aristapedia)*, homologue d'AHR, exerce une fonction déterminante dans l'organogenèse (antenne et patte) [27] et la régulation de l'expression génique.

Chez la souris, l'analyse comparée de trois phénotypes d'inactivation du gène *AHR* révèle les points de convergence suivants: le foie, qui présente une hypoplasie persistante (de 25 à 50 %) associée à une fibrose périportale, est une cible privilégiée de la déficience, la croissance pondérale est ralentie, les animaux sont réfractaires à l'induction de gènes cibles (CYP1A, Ugt1*06, aldéhyde déshydrogénase) par la dioxine, les hydrocarbures aromatiques ou la canthaxantine. De surcroît, l'expression constitutive hépatique très diminuée de ces gènes suggère l'absence d'effet d'un activateur endogène qui existerait chez la souris normale. La dioxine (2 mg/kg) n'a plus de manifestations toxiques hépatique et splénique chez la souris déficiente. Des caractères phénotypiques divergents ont été notés [28]. Fernandez-Salguero relève une anomalie de l'histologie splénique, une diminution

réversible du nombre des splénocytes (minimum 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) [29, 30]. Schmidt, sur un fond génétique identique (C57BL/6j) observe la persistance d'une stéatose et d'une hématopoïèse hépatiques jusqu'à 3 semaines et fait état d'une viabilité préservée [31]. Cependant, cette dernière lignée (distribuée par Jackson, USA) nous semble également affligée de rendements de reproduction médiocres. Une étude de tératogenèse démontre la responsabilité d'AHR dans la survenue de malformations (palais, rein) chez les souriceaux dont les mères gestantes (*AHR*^{-/-}) ont été exposées à la dioxine (40 µg/kg *per os*, 12,5 jours de gestation) [32].

La synergie d'action tératogène (fissure palatine) de l'acide rétinoïque et de la dioxine révèle une intéressante convergence de voies de signalisation. Les souris déficientes en AHR ont une perturbation de l'homéostasie de l'acide rétinoïque dont la concentration hépatique est triplée. Un défaut du catabolisme de l'acide rétinoïque expliquerait ces

concentrations élevées dont les conséquences biologiques concrètes (augmentation de la transglutaminase II et du TGFβ) peuvent concourir à la survenue du tableau anatomopathologique hépatique observé pour la déficience en AHR [30].

Les sites de fixation d'AHR, identifiés dans de nombreux promoteurs (récepteur des œstrogènes, TGFβ...) suggèrent un rôle pivot de communication entre voies de signalisation moléculaire variées pour relayer les effets toxiques de la dioxine. Cependant, il subsiste, pour des doses élevées de dioxine, une toxicité indépendante de l'expression du récepteur qui n'est que succinctement décrite [33].

Rôle de la protéine Arnt en physiopathologie

Chez la drosophile, Tango (Tgo), une protéine orthologue de Arnt, forme des hétérodimères avec les protéines Sim et Trh (Tracheless), connues pour contrôler respectivement l'embryogenèse du système nerveux central et celle du système respiratoire. Les mutations de Tgo produisent des effets représentant la somme des déficiences décrites pour les mutations de Sim et Thr [34].

Arnt (Arnt, Arnt2), partenaire d'hétérodimérisation de AHR, est un acteur déterminant de médiation de la toxicité de la dioxine. Chez la souris, l'invalidation du seul gène *Arnt* conduit à un phénotype léthal à migration, sans caractéristique commune avec l'invalidation d'AHR qui oblitère sélectivement la voie de signalisation «AHR-Arnt». Dans les tissus en développement, l'hypoxie et l'hypoglycémie locales recruterait le facteur Arnt, sous forme d'hétérodimère avec HIF (*hypoxia inducible factor*), pour stimuler l'expression de facteurs angiogéniques (VEGF, *vascular endothelial growth factor, tissue factor*); la déficience en Arnt entraîne une vascularisation insuffisante du sac vitellin et de l'embryon [35]. L'expression d'Arnt2 ne peut pallier le déficit en Arnt.

Les différences notables des phénotypes d'invalidation (drosophile/souris) suggèrent que le motif fonctionnel b-HLH-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 fondées sur l'étude d'une protéine PAS dans des espèces différentes. Considérant les différences génétiques et fonctionnelles entre AHR murin et humain, particulièrement celle relative à l'affinité pour la dioxine, il serait profitable d'introduire l'expression d'AHR humain sur un fond génétique murin déficient. Concernant une espèce sensible, chez laquelle les signes de toxicité de la dioxine sont patents, l'étude du comportement du récepteur humain serait enrichissante.

La dioxine et l'homme

L'accident de Seveso (10 juillet 1976) a répandu dans l'atmosphère plusieurs kilogrammes de dioxine. Il constitue une source majeure d'évaluation de la sensibilité humaine à la dioxine (pathologie, épidémiologie-surveillance). Dans le périmètre touché, la pollution a affecté la faune et la flore; 736 habitants ont été évacués de la zone la plus lourdement contaminée. Après décontamination, dans l'année suivante, ils ont réintégré leurs habitations. La soude contenue dans le nuage toxique fut considérée

responsable des brûlures nécrotiques cutanées, de l'œdème ou du sévère érythème observés initialement chez les personnes exposées. Dans les deux mois suivants, de nombreux cas de chloracné, plus ou moins sévères selon les zones d'exposition, ont été diagnostiqués. Les taux de dioxine sérique furent mesurés, permettant l'évaluation de la cinétique d'élimination de la dioxine chez l'homme (demi-vie de 7 ans) [36]. La surveillance sanitaire soutenue fut poursuivie durant cinq ans [37-39]. Parmi les enfants les plus sévèrement exposés (50 000 ppt = 10 000 fois l'exposition moyenne humaine), certains ont développé une chloracné réversible associée à des changements mineurs et transitoires de paramètres biologiques (glucose, cholestérol, ASAT, γ GT...) [40]. La chloracné n'a pas constitué un signe obligatoire d'exposition. Sur la base des observations, il n'a pas été établi de tableau clinique systématique et spécifique d'intoxication aiguë ou chronique chez l'homme. La comparaison aux effets puissants chez l'animal souligne la considérable variabilité de la toxicité de la dioxine en fonction de l'espèce considérée. En 1981, un programme de détection des effets différés a débuté (reproduction/développement, fréquence des cancers...). Parmi les 74 naissances survenues entre 9 mois après l'accident et la fin de l'année 1984 figuraient 26 garçons et 48 filles. Les parents possédant les taux les plus élevés de dioxine n'ont donné naissance qu'à des filles [41]. Ce déséquilibre a ensuite disparu entre 1985 et 1994. Les investigations portant sur le système immunitaire humain n'ont révélé aucun effet sur les médiateurs (sous-populations de lymphocytes, concentration d'immunoglobuline sérique, etc.) et les fonctions immunitaires [42, 43].

A Seveso, l'étude de corrélation statistique entre taux de dioxine et incidence de cancers, rendue délicate par le niveau faible des mesures, n'a pas permis d'établir de lien de causalité. De plus, il y eut très peu de cas de cancers chez les personnes les plus contaminées. Ces observations relativisent le caractère carcinogène attribué à la dioxine, considérant les doses beaucoup plus faibles auxquelles peuvent être exposées des populations normales.

L'existence de groupes à risques particuliers, dans la population générale, constitue une interrogation pertinente. De récents travaux établissent un accroissement modéré de l'incidence des cancers de tous types chez une population exposée professionnellement à des doses de dioxine 100 à 1 000 fois supérieures à celle de l'exposition de la population générale de référence [46]. Les tissus en développement de l'embryon et de l'enfant peuvent constituer une cible particulièrement sensible. A Seveso, le plus fort taux de dioxine (56 000 ppt) fut mesuré chez une fillette de 4 ans. Parmi les enfants exposés, il n'y a pas eu d'indication d'effets sérieux durant les années suivant l'accident. En période d'allaitement, les taux mesurés chez le nourrisson ont représenté 2 à 4 fois ceux de la mère, cependant aucun symptôme particulier n'a été observé dans cette population [44, 45]. Chez les personnes âgées peuvent se manifester les effets de doses cumulatives. Les valeurs mesurées restent très inférieures à celles des expositions accidentelles asymptomatiques.

Conclusions

La dioxine est incontestablement un toxique puissant, aux effets variés, chez le rongeur. Au vu des singularités fonctionnelles du récepteur AHR humain et des suites pathologiques d'exposition fortuite, la sensibilité de l'homme à la dioxine est notablement pondérée, rendant hasardeuse l'extrapolation, à l'homme, des paramètres toxicologiques définis chez un modèle animal. Les modalités du classement de la dioxine dans la catégorie A (carcinogène humain) par l'Agence Internationale pour la Recherche sur le Cancer (IARC) sont révélatrices des controverses sur le sujet. C'est un cas, rare en médecine, où l'assignation d'un effet toxique à une substance résulte d'un vote (14/10).

L'identification et l'étude d'une voie de signalisation moléculaire relayant la large majorité des effets toxiques de la dioxine constitue un atout appréciable, mais la connaissance exhaustive des effets géniques de la dioxine dans l'organisme est impérative pour mieux apprécier et prédire les risques. L'évaluation des spécificités fonctionnelles du récepteur

humain à la dioxine constitue un enjeu déterminant. Des exemples existent où une substance (proliférateurs de peroxysomes/fibrates), carcinogène chez le rongeur, ne l'est pas chez l'homme. Un faisceau d'observations convergentes étaye l'hypothèse d'une toxicité moindre de la dioxine pour l'homme.

La cohérence et la sûreté de la politique de santé publique relative à la dioxine, imposent la définition de la réglementation sanitaire sur la base de données scientifiques indubitables. La singularité de la sensibilité humaine à la dioxine est précisément la source d'un doute persistant. Dans l'attente de certitudes, il est rationnel de limiter l'exposition de la population à un minimum et d'en organiser le contrôle. La systématisation d'une démarche transparente de détection risque, si les manquements sont répétés, d'augmenter la fréquence des épisodes médiatiques sur le sujet. En contrepartie, elle répond à la demande sociétale, légitime et grandissante, en matière de sécurité sanitaire de l'aliment ■

RÉFÉRENCES

- Hombberger E, Reggiani G, Sambeth J, Wipf HK. The Seveso accident: its nature, extent and consequences. *Ann Occup Hyg* 1979; 22: 327-70.
- Pohjanvirta R, Tuomisto J. Short-term toxicity of 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin in laboratory animals: effects, mechanisms and animal models. *Pharmacol Rev* 1994; 46: 483-549.
- Neubert D. Reflections on the assessment of the toxicity of «dioxins» for humans using data from experimental and epidemiological studies. *Teratogen Carcinog Mutagen* 1997; 17: 157-215.
- Whysner J, Williams GM. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Mechanistic data and risk assessment: gene regulation, cytotoxicity, enhanced cell proliferation and tumor promotion. *Pharmacol Ther* 1996; 71: 193-223.
- Safe S. Limitations of the toxic equivalence factor approach for risk assessment of TCDD and related compounds. *Teratogen-Carcinog Mutagen* 1997; 17: 285-304.
- Nebert DW, Gelboin HV. The *in vivo* and *in vitro* inductions of aryl hydrocarbon hydroxylase in mammalian cells of different species, tissues, strains and developmental and hormonal states. *Arch Biochem Biophys* 1969; 134: 76-89.
- Whitlock JP. Induction of cytochrome P4501A1. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39: 103-25.
- Manchester DK, Gordon SK, Golas, CL, Roberts EA, Okey AB. Ah receptor in human placenta: stabilization by molybdate and characterization of binding by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, 3-méthylcholanthrene and benzo(a)pyrene. *Cancer Res* 1987; 47: 4861-8.
- Poland A, Glover E, Kende AS. 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* 1976; 251: 4936-46.
- Poland A, Knutson JC. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1982; 22: 517-54.
- Pohjanvirta R, Tuomisto J. Han/wistar rats are exceptionally resistant to TCDD. *Arch Toxicol* 1987; 11 (suppl): 344-7.
- Pohjanvirta R, Juvonen R, Kärenlampi S, Raunio H, Tuomisto J. Hepatic Ah receptor levels and the effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on hepatic microsomal monooxygenase activities in a TCDD-susceptible and -resistant rat strain. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988; 92: 131-40.
- Crosthwaite SK, Dunlap JC, Loros JJ. Neurospora wc-1 and wc-2: transcription, photoresponses, and the origins of circadian rhythmicity. *Science* 1997; 276: 763-9.
- Fukunaga BN, Hankinson O. Identification of a novel domain in the aryl hydrocarbon receptor required for DNA binding. *J Biol Chem* 1996; 271: 3743-9.
- Jain S, Dolwick KM, Schmidt JV, Bradfield CA. Potent transactivation domains of the Ah receptor and the Ah receptor nuclear translocator map to their carboxyl termini. *J Biol Chem* 1994; 269: 31518-24.
- Schmidt JV, Carver LA, Bradfield CA. Molecular characterization of the murine Ahr gene. Organization, promoter analysis, and chromosomal assignment. *J Biol Chem* 1993; 268: 22203-9.
- Gradelet S, Astorg P, Pineau T, et al. Ah receptor-dependent CYP1A induction by two carotenoids, canthaxanthin and beta-apo-8'-carotenal, with no affinity for the TCDD binding site. *Biochem Pharmacol* 1997; 54: 307-15.
- Rannug U, Rannug A, Sjoberg U, Li H, Westerholm R, Bergman J. Structure elucidation of two tryptophan-derived, high affinity Ah receptor ligands. *Chem Biol* 1995; 2: 841-55.
- Pratt WB. The role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37: 297-326.
- Coumailleau P, Poellinger L, Gustafsson JA, Whitelaw ML. Definition of a minimal domain of the dioxin receptor that is associated with Hsp90 and maintains wild type ligand binding affinity and specificity. *J Biol Chem* 1995; 270: 25291-300.
- Antonsson C, Whitelaw ML, McGuire J, Gustafsson JA, Poellinger L. Distinct roles of the molecular chaperone hsp90 in modulating dioxin receptor function *via* the basic helix-loop-helix and PAS domains. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 756-65.
- Carver LA, Bradfield CA. Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog *in vivo*. *J Biol Chem* 1997; 272: 11452-6.
- Ma Q, Whitlock JP Jr. A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Biol Chem* 1997; 272: 8878-84.
- Berghard A, Gradin K, Pongratz I, Whitelaw M, Poellinger L. Cross-coupling of signal transduction pathways: the dioxin receptor mediates induction of cytochrome P-4501A1 expression via a protein kinase C-dependent mechanism. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 677-89.
- Kobayashi A, Numayama-Tsuruta K, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y. CBP/p300 functions as a possible transcriptional coactivator of Ah receptor nuclear translocator (Arnt). *J Biochem (Tokyo)* 1997; 122: 703-10.
- Kobayashi A, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y. Cooperative interaction between AhR, Arnt and Sp1 for the drug-inducible expression of CYP1A1 gene. *J Biol Chem* 1996; 271: 12310-6.
- Mimura J, Ema M, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev* 1999; 13: 20-5.
- Duncan SA, Navas MA, Dufort D, Rossant J, Stoffel M. Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism. *Science* 1998; 281: 692-5.
- Lahvis GP, Bradfield CA. Ahr null alleles: distinctive or different? *Biochem Pharmacol* 1998; 56: 781-7.
- Gonzalez FJ, Fernandez-Salguero P. The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice. *Drug Metab Dispos* 1998; 26: 1194-8.
- Andreola F, Fernandez-Salguero PM, Chiantore MV, Petkovich MP, Gonzalez FJ, De Luca LM. Aryl hydrocarbon receptor knockout mice (AHR^{-/-}) exhibit liver retinoid accumulation and reduced retinoic acid metabolism. *Cancer Res* 1997; 57: 2835-8.
- 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 USA* 1996; 93: 6731-6.
- Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, et al. Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells* 1997; 2: 645-54.

RÉFÉRENCES

33. Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ. Arylhydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; 140: 173-9.
34. Sonnenfeld M, Ward M, Nystrom G, Mosher J, Stahl S, Crews S. The *Drosophila* tango gene encodes a bHLH-PAS protein that is orthologous to mammalian Arnt and controls CNS midline and tracheal development. *Development* 1997; 124: 4571-82.
35. Maltepe E, Schmidt JV, Baunoch D, Bradfield CA, Simon MC. Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature* 1997; 386: 403-7.
36. Needham LL, Gerthoux PM, Patterson DG Jr, et al. Serum dioxin levels in Seveso, Italy, population in 1976. *Teratogen Carcinog Mutagen* 1997; 17: 225-40.
37. Pocchiari F, Silano V, Zampieri A. Human health effects from accidental release of tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) at Seveso, Italy. *Ann NY Acad Sci* 1979; 320: 311-20.
38. Mocarelli P, Marocchi A, Brambilla P, Gerthoux P, Young DS, Mantel N. Clinical laboratory manifestations of exposure to dioxin in children. A six-year study of the effects of an environmental disaster near Seveso, Italy. *JAMA* 1986; 256: 2687-95.
39. Assennato G, Cervino D, Emmett EA, Longo G, Merlo F. Follow-up of subjects who developed chloracne following TCDD exposure at Seveso. *Am J Ind Med* 1989; 16: 119-25.
40. Mocarelli P, Needham LL, Marocchi A, et al. Serum concentrations of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and test results from selected residents of Seveso, Italy. *J Toxicol Environ Health* 1991; 32: 357-66.
41. Mocarelli P, Brambilla P, Gerthoux PM, Patterson DG Jr, Needham LL. Change in sex ratio with exposure to dioxin. *Lancet* 1996; 348: 409.
42. Holsapple MP, Snyder NK, Wood SC, Morris DL. A review of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced changes in immunocompetence: 1991 update. *Toxicology* 1991; 69: 219-55.
43. Neubert R, Golor G, Helge H, Neubert D. Risk assessment for possible effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related substances on components and functions of the immune system. *Exp Clin Immunogenet* 1994; 11: 163-71.
44. Abraham K, Knoll A, Ende M, Papke O, Helge H. Intake, fecal excretion, and body burden of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in breast-fed and formula-fed infants. *Pediatr Res* 1996; 40: 671-9.
45. Helge H. A pediatrician's view of studies on dioxin-attributed effects in children. *Toxicol Forum* 1992: 272-81.
46. Steenland K, Pacitelli L, Deddens J, Fingerhut M, Chang L. Cancer, heart disease and diabetes in workers exposed to 2,3,7,8-tetrachloro-p-dioxin. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 779-86.
47. Fujii-Kuriyama Y, Ema M, Mimura J, Matsushita N, Sogawa K. Polymorphic forms of the Ah receptor and induction of the CYP1A1 gene. *Pharmacogenetics* 1995; 5: S149-53.
48. Poland A, Palen D, Glover E. Analysis of the four alleles of the murine aryl hydrocarbon. *Mol Pharmacol* 1994; 46: 915-21.

Summary

Toxicity of dioxin: the function of the PAS proteins

Dioxin derivatives cause a major and diverse toxicity in rodents while their effects on humans remain controversial. Some recent events show that a risk for human exposure is obvious. A better understanding of the consequences of these chemicals on human biology is needed. Until then, safety procedures have to limit human exposure to a minimum. This document offers a presentation of this family of xenobiotics, their origins and their toxic effects on animal and cellular models compared to their consequences in some cases of human exposure («Seveso»). A molecular signaling pathway for most of the biological effects of dioxin is described. It includes a pair of «PAS»-domain proteins: a dioxin-activated receptor (AHR) and its heterodimeric partner (Arnt). The resulting complex activates a battery of target genes whose nature do not authorize yet the full understanding of the toxicity of dioxins. Null animal models were helpful in identifying some developmental and physiological implications of the dioxin-activated pathway.

TIRÉS À PART

T. Pineau.