

IV

Mécanismes d'action

15

Cascade moléculaire impliquant le récepteur Ah

Après la découverte par Poland en 1976 du récepteur Ah (Poland et coll., 1976), il fut progressivement établi une corrélation entre l'affinité d'un ligand pour AhR, l'induction des CYP1A hépatiques (modèle décrit ci-dessous) et la sévérité de la toxicité aiguë du ligand (Poland et coll., 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 :

- le 3-méthylchloranthrène (3-MC) administré à la souris durant 20 jours produit un tableau pathologique différent de celui de la 2,3,7,8-TCDD, alors que leurs affinités respectives pour AhR sont semblables ;
- des paramètres pharmacologiques (capacité de liaison, affinité, liaison à l'ADN) des AhR de hamster, de rat et de cobaye sont d'ordres comparables, mais la DL50 entre ces espèces diffère d'un facteur 5 000 ;
- les souches de rat Wistar H/W et Long Evans, respectivement résistantes et sensibles à la 2,3,7,8-TCDD (Pohjanvirta et Tuomisto, 1987 ; Pohjanvirta et coll., 1988), 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 2,3,7,8-TCDD. En plus du rôle prépondérant d'AhR, l'implication de cofacteur(s) conjoint(s) est probable. Des effets supplémentaires de la 2,3,7,8-TCDD, indépendants de AhR, sont proposés : 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 (*Phosphoenolpyruvate carboxykinase*) (Neubert et coll., 1997).

Récepteur Ah

Le récepteur AhR constitue un déterminant essentiel de la médiation, à l'échelle moléculaire, de la toxicité des dioxines. Son ADN complémentaire, 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 nouvelle superfamille 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 régulent la transcription. Des originalités les distinguent (présence des segments PAS et b-HLH (*basic-Helix/Loop/Helix*), absence de doigt à atome de zinc), qui confèrent son originalité à la classe des récepteurs PAS. Quarante-deux 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 simples, 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, apparaît associé à deux fonctions qui ont un lien évolutif : percevoir la lumière et appréhender le temps. Chez *Neurospora crassa* 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 variété étendue d'espèces est probable (Crosthwaite et coll., 1997).

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 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') 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 (acides aminés 9-20 et 27-39), interagit avec la région 5' du XRE qui diffère d'une boîte E (Fukunaga et Hankinson, 1996). 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. Dans AhR le segment C-terminal de PAS médie 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 coll., 1994).

230 Le promoteur du gène d'AhR (11 exons) ne contient ni « TATA box » ni « CCAAT box ». On y retrouve des sites de fixation du facteur Sp1, un site AP-1, une boîte E et un CRE (*cAMP response element*). Ces sites semblent

impliqués dans l'expression tissulaire différentielle du récepteur (Schmidt et coll., 1993), 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.

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 la 2,3,7,8-TCDD du récepteur : benzimidazoles antiulcéreux inhibiteurs de la pompe à protons (oméprazole, lansoprazole) ou anthelminthiques (thiabendazole), oxo-caroténoïdes non provitaminiques A comme la canthaxanthine, utilisée comme additif alimentaire en pisciculture pour pigmenter la chair des salmonidés (Gradelet et coll., 1997). 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 (Rannug et coll., 1995), la bilirubine et la lipoxine A4 sont généralement évoquées.

Voie de signalisation, cofacteurs

En absence de ligand, AhR est présent sous forme quiescente, complexé à hsp90, dans le cytosol (Pratt, 1997). La protéine chaperon 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 (Coumailleau et coll., 1995 ; Antonsson et coll., 1995). L'ancrage du ligand désunit AhR et hsp90. À l'instar du complexe observé avec le récepteur aux glucocorticoïdes, AhR est aussi complexé à des protéines. Ce sont des immunophilines, AIP (*AhR-interacting protein*), ARA9 (*Ah-receptor activated*) et XAP2 (*Hepatitis B virus X-associated protein 2*) (Carver et Bradfield, 1997 ; Ma et Whitlock, 1997 ; Meyer et coll., 1998) 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 (Berghard et coll., 1993). 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 (Kobayashi et coll., 1996, 1997).

Signalisation *via* Ah : impact des phosphorylations

AhR et Arnt sont des phosphoprotéines. L'origine et les conséquences des modifications post-traductionnelles qu'elles subissent 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 d'études produites en exemplaire unique ou controversées qui rend délicate la synthèse globale de la littérature sur le sujet. Ces discordances sont justifiées, d'une part, par l'introduction progressive de sondes pharmacochimiques à l'efficacité et la spécificité croissantes (inhibiteurs et activateurs de kinases et de phosphatases) et, d'autre part, à 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.

Sérine/thréonine phosphorylations : rôles de la protéine kinase C et de phosphatases

L'usage d'un inhibiteur polyvalent des protéines kinases, l'indole carbazole staurosporine sur une lignée d'hépatome de rat a révélé une diminution de la concentration cellulaire en AhR sans perturbation des capacités fonctionnelles du récepteur et une diminution de l'induction de CYP1A1, induite par la 2,3,7,8-TCDD (Singh et Perdeu, 1993). Utilisant des procédures relativement spécifiques d'activation ou, au contraire, d'inhibition de l'activité de la protéine kinase C (PKC), il a été formellement établi qu'elle est indispensable à la transduction du signal par AhR (Carrier et coll., 1992 ; Berghard et coll., 1993 ; Schafer et coll., 1993 ; Long et coll., 1998). Des études de déphosphorylation suggèrent que la phosphorylation d'AhR est importante pour sa fixation à l'ADN alors que la phosphorylation d'Arnt influencerait sur sa capacité de dimérisation (Berghard et coll., 1993). Sans dénier un rôle prépondérant à la PKC, d'autres auteurs, ne lui reconnaissent aucune influence sur l'étape de fixation d'AhR à l'ADN (Schafer et coll., 1993). Des travaux plus récents, utilisant des lignées cellulaires et des inhibiteurs spécifiques de PKC différents, confirment que l'action de la PKC dans cette voie moléculaire ne concerne pas l'étape de fixation du complexe à l'ADN (XRE) et n'affecte pas la concentration intracellulaire d'AhR (Long et coll., 1998). Une hypothèse proposée est le contrôle conjoint, par la PKC, du recrutement et/ou de la fonctionnalité de coactivateurs participant au complexe transcriptionnel.

Les effets de sérine/thréonine phosphatases ont été étudiés. Des inhibiteurs de phosphatases (calcineurine A, acide okadaïque, cyclosporine A), qui affectent principalement les protéines phosphatases 1 et 2A, augmentent substantiellement la transcription induite par la 2,3,7,8-TCDD, sans toutefois modifier le niveau de la transcription basale des gènes impliqués dans cette voie moléculaire. Il apparaît que des sérine/thréonine phosphatases, sans moduler la

fixation du complexe au XRE, sont néanmoins capables d'entraver la capacité transcriptionnelle du dimère AhR-Arnt, lors d'étapes postérieures à sa fixation à l'ADN (Li et Dougherty, 1997).

Rôles des tyrosine-kinases : fonction alternative d'AhR

L'implication de la fonction tyrosine-kinase, étudiée en utilisant des inhibiteurs comme la génistéine lors d'expositions *in vitro* de cellules à la 2,3,7,8-TCDD, n'est pas clairement élucidée. Des résultats contradictoires subsistent. Selon certains auteurs, l'inhibition des activités tyrosine-kinases est sans effet sur l'induction de CYP1A1 par la 2,3,7,8-TCDD (Backlund et coll., 1997) alors qu'elle avait été antérieurement rapportée comme inhibitrice d'une manière rapide et réversible en affectant le domaine de fixation du ligand de AhR (Gradin et coll., 1994).

Un second lien très intéressant entre activités tyrosine-kinases et récepteur Ah relève d'un effet alternatif de la 2,3,7,8-TCDD sur le récepteur. Il a été rapporté à plusieurs reprises que la 2,3,7,8-TCDD produisait, *in vivo* et *in vitro* et sur des fractions cellulaires, une augmentation rapide des activités tyrosine-kinases qui apparaît dépendante de la présence d'AhR (Enan et Matsumura, 1995). Cet effet persiste dans des extraits dépourvus de noyau ; il apparaît donc indépendant de l'activité transcriptionnelle d'AhR (Enan et coll., 1994). Plusieurs équipes ont formellement démontré l'association physique de la protéine tyrosine-kinase *c-src* (pp60^{src}) au complexe cytosolique AhR-Hsp90 et l'activation de cette activité tyrosine-kinase lors de l'exposition à la 2,3,7,8-TCDD, même dans des extraits cellulaires (Enan et Matsumura, 1996 ; Blankenship et Matsumura, 1997 ; Köhle et coll., 1999). En complément, il a été prouvé récemment que l'exposition à la 2,3,7,8-TCDD produit la dissociation de *c-src* du complexe cytosolique, son activation et sa translocation membranaire où elle est capable de procéder à la phosphorylation du récepteur à l'EGF (Köhle et coll., 1999). En présence de gel d'anamycine, qui dissocie le complexe cytosolique, cet effet de la 2,3,7,8-TCDD n'est plus observé, de même qu'il n'est plus retrouvé dans la lignée murine hétérozygote pour la déficience en *c-src*, exposée à la 2,3,7,8-TCDD (Matsumura et Matsumura, 1997). Clairement, les souris exprimant des taux réduits de *c-src* présentent, qualitativement et quantitativement, une toxicité réduite à la 2,3,7,8-TCDD. Cependant, les voies transcriptionnelles de médiation de la toxicité de la 2,3,7,8-TCDD demeurent inchangées chez ces animaux. Considérant qu'une voie primordiale de signalisation nucléaire par *c-src* dépend de *ras* par l'intermédiaire d'AP-1 (*c-src*, EGF-R, *ras*, p42/p44MAPK, phosphorylation Elk1 (Ser 383), induction de *c-fos*) une équipe a étudié la toxicité de la 2,3,7,8-TCDD chez des souris déficientes en *c-fos*. En l'absence de l'effecteur final de la cascade initiée par *c-src*, comme en absence de *c-src*, la 2,3,7,8-TCDD voit une partie de ses effets toxiques oblitérés (atrophie thymique, perte pondérale, involution du tissu adipeux) ; les autres effets toxiques sont présents (Enan et coll., 1998). Ces résultats indiquent que la toxicité *in vivo* de la 2,3,7,8-TCDD, imputable à l'activation de *c-src*, est en partie, médiée par

l'induction de *c-fos*. L'ensemble de ces observations ouvre donc une voie alternative de la toxicité de la 2,3,7,8-TCDD qui offre une corrélation satisfaisante avec l'ensemble des données de la littérature sur le sujet.

Répresseur d'AhR

Une boucle de rétrocontrôle d'activation de AhR a été décrite en 1999 (Mimura et coll., 1999). Au plan moléculaire, 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 dans AhRR. La région carboxyterminale 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 (figure 15.1). Les 150 acides aminés carboxyterminaux se révèlent cruciaux pour la fonction de répression d'AhRR. Deux sites XRE fonctionnels sont présents dans la région 5' régulatrice 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 2,3,7,8-TCDD. 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 2,3,7,8-TCDD.

Ces travaux sont évocateurs d'un lien potentiel entre la susceptibilité spécifique d'un organe à la 2,3,7,8-TCDD 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

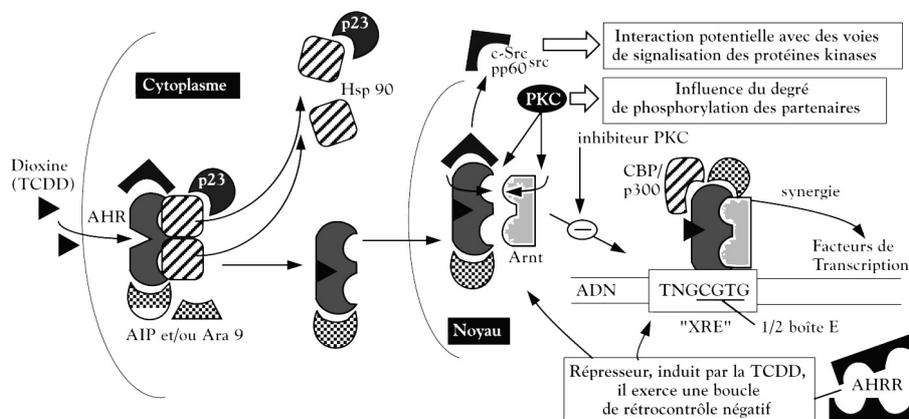


Figure 15.1 : Cascade moléculaire impliquant le récepteur Ah (aryl hydrocarbon) (d'après Pineau, communication personnelle)

Hsp : protéines de choc thermique ; *AIP* : *AhR interacting protein* ; *Ara 9* : *Ah receptor associated protein* ; *Arnt* : *AHR nuclear translocator* ; *src* : *sarc* ; *PKC* : protéine kinase C ; *CBP* : *CREBP (cAMP response element-binding protein)* ; *XRE* : *xenobiotic responsive element* ; *AHRR* : forme tronquée de *AhR* à fonction de répresseur

L'origine des différences interspécies de sensibilité à la 2,3,7,8-TCDD. Ces travaux sont très 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) (Israel et coll., 1985 ; Daujat et coll., 1996). L'origine de cette superinduction 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.

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 déshydrogénases) 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 aux 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 exemple en analysant le transcriptome par nanométrie dans une variété d'espèces et de tissus.

Pharmacogénétique d'AhR et Arnt chez le rongeur de laboratoire

La sensibilité interspécies à la 2,3,7,8-TCDD est remarquablement contrastée comme le reflètent les DL_{50} observées chez le cochon d'Inde (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$), le hamster (1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ou le rat Han Wistar (9 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$). 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 2,3,7,8-TCDD. Le modèle animal historiquement le mieux documenté est la souris, cependant, les avancées les plus importantes dans ce domaine ont été réalisées ces dernières années en étudiant la pharmacogénétique du rat en relation à sa sensibilité à la 2,3,7,8-TCDD.

Il est établi que pour les lignées consanguines de souris C57BL/6 et DBA/2 la sensibilité à la 2,3,7,8-TCDD (pour la majeure partie des effets incluant la létalité) possède un support génétique : le locus Ah. La dose de 2,3,7,8-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 supérieure (Poland et Glover, 1980 ; Chapman et Schiller, 1985). Dans la souche DBA/2, deux paramètres concourent à la moindre sensibilité à la 2,3,7,8-TCDD : AhR est exprimé plus faiblement et son affinité vis-à-vis de la 2,3,7,8-TCDD est considérablement réduite (Okey, et coll., 1989). L'origine moléculaire de la différence de sensibilité à la 2,3,7,8-TCDD 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 (Poland et coll., 1994 ; Ema et coll., 1994). 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.

Cependant, la découverte et la caractérisation d'un nouveau modèle animal de sensibilité différentielle à la 2,3,7,8-TCDD 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 DL_{50} de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ se révèlent pratiquement 1000 fois plus sensibles que les seconds (DL_{50} de 9 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$) aux effets de toxicité aiguë de la 2,3,7,8-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 anormalement faible d'AhR chez le rat LE (98kDa/106kDa) associée à une expression trois fois plus basse du partenaire de dimérisation Arnt (Pohjanvirta et coll., 1999). 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 2,3,7,8-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 2 000 µg/kg de 2,3,7,8-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 2,3,7,8-TCDD. Il est surprenant de constater que la distribution de ces allèles est sans effet sur la réponse inductive de CYP1A1 (Tuomisto et coll., 1999). 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 (Pohjanvirta et coll., 1998). En complément, une étude conduite sur huit souches de rats les a classées en catégories faibles et forts répondeurs à la 2,3,7,8-TCDD. Les forts répondeurs présentent une surexpression (X4) du messenger d'AhR. Il a été simultanément identifié dans toutes les souches l'existence conjointe de deux messenger d'Arnt, dont l'un est tronqué (45 pb) dans le segment basique du domaine b-HLH. Les souches les plus sensibles à la 2,3,7,8-TCDD sont celles qui expriment la plus forte proportion de messenger Arnt intègre (Jana et coll., 1998). 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 2,3,7,8-TCDD.

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 médiation des effets toxiques de la 2,3,7,8-TCDD. Deux questions sont déterminantes dans ce contexte. AhR médie-t-il toute ou partie de la toxicité de la 2,3,7,8-TCDD ? 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 ?

Dans le premier modèle considéré, la drosophile ss « *spineless-aristapedia* », homologue d'AhR, exerce une fonction déterminante dans l'organogenèse (antenne et patte) (Duncan et coll., 1998) et la régulation d'expression génique (bab : « bric à 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.

Dans le 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 d'inactivation de gènes « *gene knock out* » d'AhR extrêmement voisins techniquement. Les fruits de leurs travaux ont été publiés en 1996 (Fernandez-Salguero et coll., 1996 ; Schmidt et coll., 1996) et en 1997 (Mimura et coll., 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 (portion codante de l'exon 1 pour Fernandez et Mimura, exon 2 pour Schmidt), les cellules ES sont d'origine génétique 129SV dans les trois cas et le génotype à été transféré sur fond génétique C57BL/6. Ces concordances méthodologiques garantissent la justesse des comparaisons de résultats opérées entre ces travaux. L'analyse comparée de ces trois phénotypes d'inactivation 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 (McDonnell et coll., 1996), 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 2,3,7,8-TCDD, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Foussat et coll., 1998) ou la canthaxantine (Gradelet et coll., 1997). 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 2,3,7,8-TCDD (2 mg/kg) n'a plus de manifestations toxiques hépatique et splénique chez la souris déficiente (Fernandez-Salguero et coll., 1996). Ce modèle animal a permis à une équipe de disséquer l'origine cytologique des manifestations toxiques de la 2,3,7,8-TCDD 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 (Thurmond et coll., 1999).

Des caractères phénotypiques divergents ont été notés (Lahvis et Bradfiel, 1998). Fernandez-Salguero 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) (Andreola et coll., 1997 ; Gonzalez et Fernandez-Salguero, 1998). Schmidt, 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 (Schmidt et coll., 1996). 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 (Abbot et coll., 1999). La lignée déficiente générée par les travaux de Schmidt (distribuée par Jackson Laboratories, États-Unis) nous semble également affligée de rendements de reproduction médiocres, contrairement aux indications initiales de cette équipe (observation rapportée par l'auteur).

Publiant la dernière, l'équipe de Fujii-Kuriyama a concentré ses efforts sur un aspect crucial des effets de la 2,3,7,8-TCDD qui n'avait pas été considéré dans les deux premières études : le caractère tératogène de la 2,3,7,8-TCDD. Des femelles gestantes, de type sauvage ou déficientes en AhR, ont été exposées à la 2,3,7,8-TCDD (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 ont une incidence de 0 % chez les fœtus déficients en AhR. Les auteurs établissent la nature indispensable d'AhR dans la manifestation des effets tératogènes de la 2,3,7,8-TCDD chez la souris (Mimura et coll., 1997). 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 2,3,7,8-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, du maxillaire supérieur et de certains territoires neurologiques. 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 (Willey et coll., 1998). 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 2,3,7,8-TCDD.

La synergie d'action tératogène (fissure palatine) de l'acide rétinoïque et de la 2,3,7,8-TCDD révèle une intéressante convergence de voies de signalisation. On sait que les rétinoïdes contrebalancent les effets carcinogéniques *in vitro* d'hydrocarbures polycycliques aromatiques (Hong et Lotau, 1993 ; Lorick et coll., 1998) et que les symptômes d'une exposition aux PCDF ressemblent à ceux d'une déficience en vitamine A (Kimbrough, 1974). 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 déshydrogénase ADH1/ADH2 (métabolisme du rétinaldéhyde). CYP1A2 n'est pas réputé participer à l'homéostasie des rétinoïdes. Les gènes de l'aldéhyde déshydrogénase 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 (Andreola et coll., 1997). Un défaut, non élucidé, du métabolisme dégradatif de l'acide rétinoïque expliquerait ces taux élevés dont les conséquences biologiques concrètes (augmentation de la transglutaminase II, du *transforming growth factor* β peuvent concourir à la survenue du tableau anatomopathologique hépatique observé pour la déficience en AhR (Andreola et coll., 1997).

Les sites de fixation d'AhR, identifiés dans de nombreux promoteurs (récepteur aux œstrogènes, TGF β ...) suggèrent un rôle pivot de communication entre des voies de signalisation moléculaire variées pour médier les effets toxiques de la 2,3,7,8-TCDD. Cependant il subsiste, pour des doses élevées de 2,3,7,8-TCDD, une toxicité résiduelle indépendante de l'expression du récepteur qui n'est que succinctement décrite (Fernandez-Salguero et coll., 1996). À la dose de 2 mg/kg/j de 2,3,7,8-TCDD, 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 2,3,7,8-TCDD, à très forte dose, qui emprunte une voie de signalisation indépendante d'AhR.

Enfin, 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 (« Fernandez »). Les fibroblastes déficients ont une sénescence plus précoce et une immortalisation considérablement différée. Ordinairement, la 2,3,7,8-TCDD 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 PPAR γ , la différenciation adipocytaire et le contrôle de l'arrêt du cycle cellulaire (Alexander et coll., 1998)

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 (*Trachealless*), 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 (Sonnenfeld et coll., 1997).

Arnt (Arnt, Arnt2), partenaire d'hétérodimérisation de AhR, est un acteur déterminant de médiation de la toxicité de la 2,3,7,8-TCDD. L'invalidation du seul gène Arnt conduit à un phénotype murin léthal à mi-gestation, 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 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 (Maltepe et coll., 1997). L'expression d'Arnt2 ne peut pallier la déficience en Arnt.

En résumé, les différences notables des phénotypes d'invalidation (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 2,3,7,8-TCDD sont patents, l'étude du comportement du récepteur humain serait enrichissant.

En conclusion, le caractère indispensable du récepteur Ah dans la médiation de certains effets de la 2,3,7,8-TCDD est désormais acquis grâce aux travaux récents ayant abouti à la création indépendante de trois lignées murines d'invalidation du gène du récepteur Ah. En l'absence de ce gène, on n'observe

pas les manifestations classiquement décrites (hépatotoxicité, cancers, malformations).

La structure du récepteur Ah est apparentée aux récepteurs nucléaires à domaine PAS (Per-AhR-Sim) qui interagissent avec l'ADN, au niveau de séquences reconnues dans la région régulatrice des gènes qu'ils transactivent. L'activation du récepteur Ah par un ligand comme la 2,3,7,8-TCDD conduit à une cascade d'événements qui aboutissent à l'induction de la transcription de gènes cibles. Les séquences reconnues sont présentes dans un nombre considérable de gènes qui ne sont pas tous identifiés.

BIBLIOGRAPHIE

ABBOTT BD, SCHMID JE, PITT JA, BUCKALEW AR, WOOD CR et coll. Adverse reproductive outcomes in the transgenic Ah receptor-deficient mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999 ; **155** : 62-70

ALEXANDER DL, GANEM LG, FERNANDEZ-SALGUERO P, GONZALEZ FJ, JEFSCOATE CR. Aryl-hydrocarbon receptor is an inhibitory regulator of lipid synthesis and of commitment to adipogenesis. *J Cell Sci* 1998, **111** : 3311-3322

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** : 2835-2838

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** : 756-765

BACKLUND M, JOHANSSON I, MKRTCHIAN S, INGELMAN-SUNDBERG M. Signal transduction-mediated activation of the aryl hydrocarbon receptor in rat hepatoma H4IIE cells. *J Biol Chem* 1997, **272** : 31755-31763

BERGHARD A, GRADIN K, PONGRATZ I, WHITELAW M, POELLINGER L. Cross-coupling of signal transduction pathways : the dioxin receptor mediates induction of cytochrome P-450IA1 expression *via* a protein kinase C-dependent mechanism. *Mol Cell Biol* 1993, **13** : 677-689

BLANKENSHIP A, MATSUMURA F. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced activation of a protein tyrosine kinase, pp60src, in murine hepatic cytosol using a cell-free system. *Mol Pharmacol* 1997, **52** : 667-675

CARRIER F, OWENS RA, NEBERT DW, PUGA G. Dioxin-dependent activation of murine Cyp1a-1 gene transcription requires protein kinase C-dependent phosphorylation A. *Mol Cell Biol* 1992, **12** : 1856-1863

CARVER LA, BRADFIELD CA. Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog *in vivo*. *J Biol Chem* 1997, **272** : 11452-11456

CHAPMAN DE, SCHILLER CM. Dose-related effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in C57BL/6J and DBA/2J mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985, **78** : 147-157

- 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** : 25291-25300
- CROSTHWAITE SK, DUNLAP JC, LOROS JJ. Neurospora *wc-1* and *wc-2* : transcription, photoresponses, and the origins of circadian rhythmicity. *Science* 1997, **276** : 763-769
- DAUJAT M, CHARRASSE S, FABRE I, LESCA P, JOUNAIDI Y et coll. Induction of CYP1A1 gene by benzimidazole derivatives during Caco-2 cell differentiation. Evidence for an aryl-hydrocarbon receptor-mediated mechanism. *Eur J Biochem* 1996, **237** : 642-652
- DUNCAN SA, NAVAS MA, DUFORT D, ROSSANT J, STOFFEL M. Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism. *Science* 1998, **281** : 692-6955
- EMA M, OHE N, SUZUKI M, MIMURA J, SOGAWA K et coll. Dioxin binding activities of polymorphic forms of mouse and human arylhydrocarbon receptors. *J Biol Chem* 1994, **269** : 27337-27343
- ENAN E, MATSUMURA F. Significance of TCDD-induced changes in protein phosphorylation in the adipocyte of male guinea pigs. *J Biochem Toxicol* 1994, **9** : 159-170
- ENAN E, MATSUMURA F. Evidence for a second pathway in the action mechanism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). Significance of Ah-receptor mediated activation of protein kinase under cell-free conditions. *Biochem Pharmacol* 1995, **49** : 249-261
- ENAN E, MATSUMURA F. Identification of *c*-Src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway. *Biochem Pharmacol* 1996, **52** : 1599-1612
- ENAN E, DUNLAP DY, MATSUMURA F. Use of *c*-Src and *c*-Fos knockout mice for the studies on the role of *c*-Src kinase signaling in the expression of toxicity of TCDD. *J Biochem Mol Toxicol* 1998, **12** : 263-274
- FERNANDEZ-SALGUERO P, PINEAU T, HIBERT DM, MCPHAIL T, LEE ST et coll. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* 1995, **268** : 722-726
- FERNANDEZ-SALGUERO P, HILBERT DM, RUDIKOFF S, WARD JM, GONZALEZ FJ. Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996, **140** : 173-179
- FOUSSAT J, COSTET P, GALTIER P, PINEAU T, LESCA P. The 4S benzo(a)pyrene-binding protein is not a transcriptional activator of *Cyp1a1* gene in Ah receptor-deficient (AhR^{-/-}) transgenic mice. *Arch Biochem Biophys* 1998, **349** : 349-355
- FUKUNAGA BN, HANKINSON O. Identification of a novel domain in the aryl hydrocarbon receptor required for DNA binding. *J Biol Chem* 1996, **271** : 3743-37499
- GONZALEZ FJ, FERNANDEZ-SALGUERO P. The aryl hydrocarbon receptor : studies using the AhR-null mice. *Drug Metab Dispos* 1998, **26** : 1194-1198
- GRADELET S, ASTORG P, PINEAU T, CANIVENC MC, SIESS MH et coll. 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** : 307-315

GRADIN K, WHITELAW ML, TOFTGARD R, POELLINGER L, BERGHARD A. A tyrosine kinase-dependent pathway regulates ligand-dependent activation of the dioxin receptor in human keratinocytes. *J Biol Chem* 1994, **269** : 23800-23807

HONG WK, LOTAU R. *Retinoids in oncology*. New York : Marcel Dekker, 1993

ISRAEL DI, ESTOLANO MG, GALCAZZI DR, WHITLOCK J. Superinduction of cytochrome P1-450 gene transcription by inhibition of protein synthesis in wild type and variant mouse hepatoma cells. *J Biol Chem* 1985, **260** : 5648-5643

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** : 31518-31524

JANA NR, SARKAR S, YONEMOTO J, TOHYAMA C, SONE H. Strain differences in cytochrome P4501A1 gene expression caused by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the rat liver : role of the aryl hydrocarbon receptor and its nuclear translocator. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, **248** : 554-558

KIMBROUGH RD. The toxicity of polychlorinated polycyclic compounds and related chemicals. *Crit Rev Toxicol* 1974, **2** : 445-498

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** : 12310-12316

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* 1997, **122** : 703-710

KOHLE C, GSCHAIDMEIER H, LAUTH D, TOPELL S, ZITZER H, BOCK KW. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)-mediated membrane translocation of c-Src protein kinase in liver WB-F344 cells. *Arch Toxicol* 1999, **73** : 152-158

LAHVIS GP, BRADFIELD CA. AhR null alleles : distinctive or different ? *Biochem Pharmacol* 1998, **56** : 781-787

LI SY, DOUGHERTY JJ. Inhibitors of serine/threonine-specific protein phosphatases stimulate transcription by the Ah receptor/Arnt dimer by affecting a step subsequent to XRE binding. *Arch Biochem Biophys* 1997, **340** : 73-82

LONG WP, PRAY-GRANT M, TSAI JC, PERDEW GH. Protein kinase C activity is required for aryl hydrocarbon receptor pathway-mediated signal transduction. *Mol Pharmacol* 1998, **53** : 691-700

LORICK KL, TOSCANO DL, TOSCANO JR WA. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin alters retinoic acid receptor function in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, **243** : 749-752

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** : 8878-8884

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** : 403-407

- MATSUMURA F, ENAN E, DUNLAP DY, PINKERTON KE, PEAKE J. Altered *in vivo* toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in C-SRC deficient mice. *Biochem Pharmacol* 1997, **53** : 1397-404
- MCDONNELL WM, CHENSUE SW, ASKAGI FK, MOSELEY RH. Hepatic fibrosis in AhR-/- mice *Science* 1996, **271** : 224
- MEYER BK, PRAY-GRANT MG, VANDEN HEUVEL JP, PERDEW GH. Hepatitis B virus protein 2 is a subunit of an unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity. *Mol Cell Biol* 1998, **18** : 978-988
- MIMURA J, YAMASHITA K, NAKAMURA K, MORITA M, TAKAGI TN et coll. Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells* 1997, **2** : 645-654
- 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** : 20-25
- NEUBERT D. Reflections on the assessment of the toxicity of « dioxins » for humans using data from experimental and epidemiological studies. *Teratog Carcinog Mutagen* 1997, **17** : 157-215
- OKEY AB, VELLA LM, HARPER PA. Detection and characterization of a low affinity form of cytosolic Ah receptor in livers of mice nonresponsive to induction of cytochrome P1-450 by 3-methylcholanthrene. *Mol Pharmacol* 1989, **35** : 823-830
- POHJANVIRTA R, TUOMISTO J. Han/Wistar rats are exceptionnally resistant to TCDD. *Arch Toxicol* 1987, **11** : 344-347
- POHJANVIRTA R, JUVONEN R, KÄRENLAMPI S, RAUNIO H, TUOMISTO J. Hepatic Ah receptor levels and the effect of 2,3,7,8-tetrachloro dibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on hepatic microsomal monooxygenase activities in a TCDD-susceptible and -resistant rat strain. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988, **92** : 131-140
- POHJANVIRTA R, WONG JMY, LI W, HARPER PA, TUOMISTO J, OKEY AB. Point mutation in intron sequence causes altered carboxyl-terminal structure in the aryl hydrocarbon receptor of the most 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-resistant rat strain. *Mol Pharmacol* 1998, **54** : 86-93
- POHJANVIRTA R, VILUKSELA M, TUOMISTO JT, UNKILA M, KARASINSKA J et coll. Physicochemical differences in the AH receptors of the most TCDD-susceptible and the most TCDD-resistant rat strains. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999, **155** : 82-95
- 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** : 4936-4946
- POLAND A, GLOVER E. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin : segregation of toxicity with the Ah locus. *Mol Pharmacol* 1980, **17** : 86-94
- 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** : 517-554
- POLAND A, PALEN D, GLOVER E. Analysis of the four alleles of the murine aryl hydrocarbon receptor. *Mol Pharmacol* 1994, **46** : 915-921

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

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** : 841-8455

SCHAFFER MW, MADHUKAR BV, SWANSON HI, TULLIS K, DENISON MS. Protein kinase C is not involved in Ah receptor transformation and DNA binding. *Arch Biochem Biophys* 1993, **307** : 267-271

SCHMIDT JV, CARVER LA, BRADFIELD CA. Molecular characterization of the murine AhR gene. Organization, promoter analysis, and chromosomal assignment. *J Biol Chem* 1993, **268** : 22203-22209

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** : 6731-6736

SINGH SS, PERDEW GH. Alterations in the Ah receptor level after staurosporine treatment. *Arch Biochem Biophys* 1993, **305** : 170-175

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** : 4571-4582

THURMOND TS, SILVERSTONE AE, BAGGS RB, QUIMBY FW, STAPLES JE, GASIEWICZ TA. A chimeric aryl hydrocarbon receptor knockout mouse model indicates that aryl hydrocarbon receptor activation in hematopoietic cells contributes to the hepatic lesions induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999, **158** : 33-40

TUOMISTO JT, VILUKSELA M, POHJANVIRTA R, TUOMISTO J. The Ah receptor and a novel gene determine acute toxic responses to TCDD : segregation of the resistant alleles to different rat lines. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999, **155** : 71-81

WILLEY JJ, TRIPP BR, BAGGS RB, GASIEWICZ TA. Aryl hydrocarbon receptor activation in genital tubercle, palate and other embryonic tissues in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-responsive *lacZ* mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998, **151** : 33-44