



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1

sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie et Sciences de la Santé

École doctorale VIE-AGRO-SANTE

présentée par

Nicolas Quesnot

Préparée à l'unité de recherche UMR INSERM U991
Foie, Métabolismes et Cancer
Faculté des Sciences Pharmaceutiques & Biologiques

Évaluation de la
génotoxicité des
contaminants
environnementaux,
production de lignées
bio-senseurs et mesure
de l'activité
enzymatique du
cytochrome P450 2E1
dans les cellules
d'hépatome humain
HepaRG.

**Thèse soutenue à Rennes
Le 30 avril 2015**

devant le jury composé de :

Martine Aggerbeck

Chargé de recherche – Université de Paris Descartes
Rapporteur

Jean-Marc Pascussi

Chargé de recherche – Institut de génomique fonctionnelle
de Montpellier
Rapporteur

Laurent Corcos

Directeur de recherche – Université de Brest
Examineur

Daniel Zalko

Directeur de recherche – Université Paul Sabatier,
Toulouse
Examineur

Vincent Lagente

Professeur – Université de Rennes 1
Examineur

Pascal Loyer

Chargé de recherche – Université de Rennes 1
Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été réalisés au sein de l'Inserm UMR 991 « Foie, Métabolismes et Cancer », grâce à une allocation de recherche doctorale cofinancée par la région Bretagne et la Ligue contre le Cancer (comités départementaux d'Ille et vilaine et des Côtes-d'Armor).

Je souhaite tout d'abord adresser mes remerciements aux membres du jury, Martine Aggerbeck, Jean-Marc Pascussi, Laurent Corcos, Daniel Zalko et Vincent Lagente. Merci d'avoir accepté d'évaluer ces travaux de thèse et pour le regard d'expert que vous y avez apporté.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Docteur Pascal Loyer, sans qui je ne soutiendrais probablement pas ma thèse aujourd'hui. Merci d'avoir manifesté de l'intérêt pour mes travaux et de m'avoir soutenu dans les moments difficiles. Toujours disponible, tu as su, en fin pédagogue, me faire partager ton expérience. Pour tout cela, merci.

Merci à Bernard Fromenty pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et pour ses précieux conseils et ses remarques toujours pertinentes sur mes travaux.

Je remercie également Christiane et André Guillouzo pour avoir partagé leur expertise et pour leur gentillesse au cours de ces trois ans.

Un grand merci à Vincent Lagente et Elisabeth Boichot-Laurent pour nous avoir permis à Tatiana et moi d'en arriver là aujourd'hui.

Merci à l'équipe 2 et en particulier Anne, Caroline, Claudine, Catherine, Kathleen et Karim pour votre aide dans la réalisation de ces travaux et pour m'avoir « adopté » au sein de votre équipe. Un grand merci à tous les membres de l'U991 que j'ai eu l'occasion de côtoyer de près ou de loin pendant ces trois ans.

En tant que membre honoraire du bureau 15, je remercie tous ses occupants actuels et passés, en particulier Ahmad, Anaïs, Audrey, Camille, Houssein, Matthew et Sacha pour les fous rires et les blagues potaches partagées. Pour cela, je remercie également ceux qui n'ont pas eu la chance d'en faire partie comme Simon, Aude, Thomas O, Eva, Sophie, Florence, Patricia, Karine et Carine.

Un merci tout particulier à Dounia pour son aide précieuse lors de la rédaction de ce manuscrit et à Thomas G. pour ses judicieux conseils en HPLC.

Enfin je remercie ma famille, Tatiana pour sa présence tout au long de ce projet et ceux à venir et ma maman pour son soutien indéfectible depuis toutes ces années et pour accepter de me suivre dans un futur proche....

Enfin, j'exprime ma plus profonde gratitude envers le Docteur Marie-Anne Robin, pour m'avoir encadré pendant ces trois années de thèse, pour son écoute et sa disponibilité malgré les circonstances ainsi que pour m'avoir transmis sa passion et son savoir.

I. INTRODUCTION

1. LES ENZYMES DU METABOLISME DES XENOBIOTIQUES.....	1
1.1. Les cytochromes P450 (CYPs).....	1
1.1.1. Cycle catalytique des CYPs.....	1
1.1.2. Nomenclature et classification	3
1.1.3. Implication des CYPs dans le métabolisme endogène.....	4
1.1.4. Métabolisme des substances exogènes.....	5
1.1.5. Distribution	6
a. Localisation organotypique	6
b. Zonation métabolique.....	7
c. Synthèse et adressage aux organites.....	8
➤ Adressage des CYPs au réticulum endoplasmique	10
➤ Adressage des CYPs à la mitochondrie	10
1.1.6. Régulation	12
a. Facteurs physiopathologiques	13
b. Facteurs génétiques et épigénétiques	14
c. Régulation transcriptionnelle.....	15
➤ Le récepteur PXR	15
➤ Le récepteur CAR	16
➤ Le récepteur AhR	17
➤ Les récepteurs PPARs.....	18
➤ Intérêt pharmacologique des récepteurs nucléaires	18
1.1.7. Le CYP2E1.....	20
a. Polymorphisme génétique et régulation physiopathologique du CYP2E1	20
b. Régulation du CYP2E1 par les xénobiotiques.....	22
c. Implication dans la toxicité des xénobiotiques	22
d. Méthode de dosage de l'activité enzymatique du CYP2E1.....	23
➤ Activité aniline hydroxylase	23
➤ Le <i>p</i> -nitrophénol	24
➤ Le N-diméthylnitrosamine (NDMA)	24
➤ La chlorzoxazone (CZX)	25
1.1.8. Le CYP2B6.....	27
a. Polymorphisme et régulation physiopathologique.....	28

b. Régulation par les xénobiotiques.....	29
c. Implication dans la toxicité des xénobiotiques.....	29
1.1.9. Le CYP3A4	30
a. Polymorphisme génétique et régulation physiopathologique du CYP3A4.....	30
b. Régulation par les xénobiotiques.....	31
c. Implication dans la toxicité des xénobiotiques.....	31
1.1.10. Le CYP1A1	32
a. Polymorphismes et régulation physiopathologique.....	33
b. Régulation par les xénobiotiques.....	34
c. Implication dans la toxicité des xénobiotiques.....	34
1.2. Les enzymes de phase II.....	35
1.2.1. Les uridine 5'-phosphoglucuronosyltransférases	35
a. Généralités	35
b. Spécificité de substrats des UGTs	36
c. Régulation des UGTs	38
1.2.2. Les Glutathion-S-Transférases (GSTs)	38
a. Généralités	38
b. Spécificité de substrats	39
c. Régulation des GSTs cytosoliques.....	39
d. Régulation de la signalisation apoptotique et proliférative par les GSTs	40
1.3. Les modèles hépatiques <i>in vitro</i>.....	41
1.3.1. Les cultures primaires d'hépatocytes humain.....	41
1.3.2. Les lignées cellulaires.....	43
a. La lignée HepaRG	43
2. LA CARCINOGENESE.....	45
2.1. La carcinogénèse hépatique.....	45
2.2. Altérations génétiques et moléculaires liées au CHC.....	46
2.2.1. Les sources d'altérations génétiques.....	46
a. Les espèces réactives de l'oxygène	47
b. Les espèces réactives de l'azote.....	49
c. Les alkylations	49

2.2.2. Les altérations non-génotoxiques.....	50
a. Effet récepteur dépendant.....	50
b. Inhibition de la communication intercellulaire <i>via</i> les jonctions GAP	50
c. Raccourcissement des télomères.....	51
d. Les modifications épigénétiques.....	51
➤ Méthylation de l'ADN	52
➤ Modifications post-traductionnelles des histones	52
➤ Les microARN.....	53
3. EVALUATION DU RISQUE CARCINOGENIQUE ET GENOTOXIQUE.....	54
3.1. Stratégie actuelle en Union Européenne	54
3.2. Méthodes <i>in vitro</i> d'évaluation du risque génotoxique.....	56
3.2.1. Optimisation des méthodes existantes	56
a. Le test des micronoyaux.....	56
➤ Le problème des faux positifs.....	57
➤ La nécessité de développer et de valider de nouveaux modèles.....	58
3.2.2. Développement de méthodes basées sur de nouveaux critères d'évaluation.....	59
a. Le test de mutation du gène <i>PIG-A</i>	59
b. Quantification de la phosphorylation de l'histone γ H2AX (test γ H2AX).....	60
c. Induction des voies de stress et de dommages à l'ADN	61
d. Activation des récepteurs nucléaires.....	61
e. Approche <i>in silico</i> basée sur la relation structure-activité (SAR)	64
f. La toxicogénomique	64
4. LES CONTAMINANTS ENVIRONNEMENTAUX	66
4.1. L'aflatoxine b1	66
4.2. Le méthyle méthane sulfonate	67
4.3. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques.....	67
4.3.1. Le benzo[a]pyrène	67
4.3.2. Le fluoranthène.....	68
4.3.3. Le 7,12-diméthylbenz[a]anthracène (DMBA)	69

4.4. Les pesticides	69
4.4.1. L'endosulfan.....	69
4.4.2. Le fipronil	70
4.5. Les perturbateurs endocriniens	70
4.5.1. Le diéthylhexylphthlate (DEHP)	70
4.5.2. Le tetrabromo-bisphénol A (TBBPA).....	71
4.5.3. Le bisphénol A.....	72

II. RESULTATS ET DISCUSSION

1. CADRE ET BUT DU TRAVAIL	85
2. ARTICLE 1	88
Evaluation of genotoxicity using automated detection of γ H2AX in metabolically competent HepaRG cells	
3. ARTICLE 2	115
HepaRG cell-based biosensors for rapid detection of cytochrome P450 1A1, 2B6, 3A4 and GSTA1 transcriptional inductions by xenobiotics	
4. ARTICLE 3	148
Expression et activité du cytochrome P450 2E1 dans les modèles de culture d'hépatocytes	
5. DISCUSSION	174
6. BIBLIOGRAPHIE	179

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Métabolisme des xénobiotiques au niveau de l'hépatocyte	1
Figure 2 : Représentation schématique du cycle catalytique des CYPs	3
Figure 3 : Contribution des différentes EMXs et des différents CYPs	6
Figure 4 : Zonation des différents processus métaboliques au sein des sous-populations hépatocytaires selon l'axe porto-central du lobule hépatocytaire.	8
Figure 5 : Organisation des séquences d'adressage des CYP2E1 et 1A1 au réticulum endoplasmique et à la mitochondrie..	9
Figure 6 : Adressage co-translationnel des CYPs à la mitochondrie et au réticulum endoplasmique.....	11
Figure 7 : Métabolisme hépatique de l'aniline.	23
Figure 8 : Mécanisme de glucuronidation par les UGTs	36
Figure 9 : Caractéristiques du modèle HepaRG	44
Figure 10 : Principales sources d'espèces réactives de l'azote et de l'oxygène.	48
Figure 11 : Stratégie d'évaluation de la génotoxicité.	55
Figure 12 : Système double-hybride de screening des activateurs de récepteurs nucléaires.	63
Figure 13 Formules développées des contaminants environnementaux utilisés dans notre étude.	66
Figure 14 : Métabolisme du Benzo[a]pyrène	68
Tableau 1 : Substrats des UGTs et facteurs de transcriptions impliqués dans leur régulation.	37

Abréviations

ADH	Alcool Déshydrogénase
AhR	Aryl Hydrocarbon Receptor
AKR	Aldo-Kéto Réductase
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
AMPK	AMP-activated protein Kinase
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
CAR	Constitutive Androstane Receptor
CEPT-1	Choline/ethanolamine phosphotransférase 1
COMT	Catéchol-o-methyl transférase
Cx	Connexines
CYP	Cytochrome P450
CZX	Chlorzoxazone
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DRE	Dioxin Responsive Element
EMX	Enzyme du Métabolisme des Xénobiotiques
ERO	Espèce Réactive de l'Oxygène
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FMN	Flavine Mononucléotide
GSH / GSSG	Glutathion réduit / oxydé
GST	Glutathion-S-Transférases
HAP	Hydrocarbure aromatique polycyclique
HCZX	6-Hydroxychlorzoxazone
HNF	Hepatic Nuclea Factor
HSP	Heat Shock Protein
IL	Inter-leukine
JAK	Janus Kinase
LBD	Ligand Binding Domain
MAPEG	Membrane Associated Proteins involved in Eicosanoid and Glutathione metabolism
NADH/NAD+	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NAPQI	N-Acétyle- <i>P</i> -benzoquinone imine
NAT	N-Acétyle-transférase
NCZX	Chlorzoxazone-N-glucuronide

NDMA	N-Diméthylnitroamine
NF	Nuclear Factor
OCZX	Chlorozoxazone-O-glucuronide
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycérol-3-phosphocholine
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PXR	Pregnane X Receptor
RE	Réticulum Endoplasmique
RXR	Retinoid X Receptor
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SRP	Signal Recognition Particule
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
SULT	SULfoTransférerase
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxine
TIM	Translocase of the inner Membrane
TNF- α	Tumor Necrosis Factor
TOM	Translocase of the Outer Membrane
UGT	Uridine 5'-phosphoglucuronosyltransférerase

I. INTRODUCTION

1. Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques

1.1. Les cytochromes P450 (CYPs)

L'exposition humaine aux xénobiotiques est constante. D'origine médicamenteuse, industrielle ou alimentaire, ces contaminants souvent lipophiles peuvent pénétrer dans l'organisme, mais nécessitent souvent une transformation préalable par les enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMXs) pour être éliminés. Ces enzymes sont subdivisées en trois classes : **les enzymes de phase I** dites de fonctionnalisation, permettant de modifier une fonction chimique (OH, NH₂, COOH) le plus souvent par **oxydation**. Les **enzymes de phase II**, permettant la **conjugaison** d'un groupement polaire (glutathion, sulfate, acide glucuronique, etc.) sur la molécule initiale ou sur le métabolite fonctionnalisé lors de la phase I. Enfin, les transporteurs membranaires sont des glycoprotéines membranaires permettant le transport actif des composés formés hors de la cellule (figure 1).

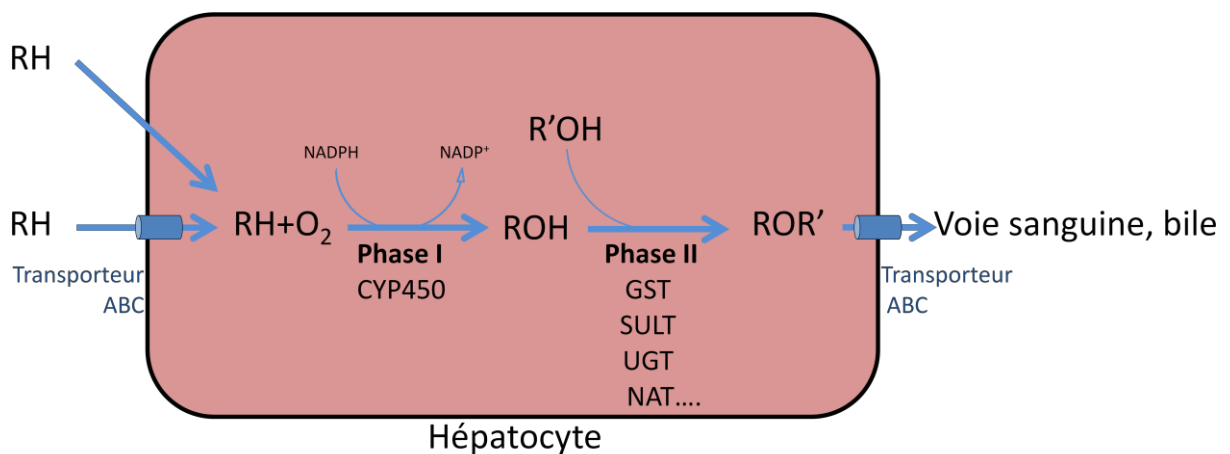
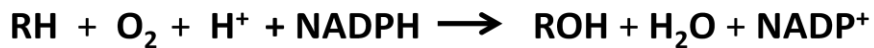


Figure 1 : Métabolisme des xénobiotiques au niveau de l'hépatocyte

1.1.1. Cycle catalytique des CYPs

Les CYPs sont des protéines monomériques d'environ 500 acides aminés, ayant été initialement identifiées par spectrométrie grâce à leur propriété d'absorption à 450nm, sous forme réduite et complexée avec le monoxyde de carbone. C'est d'ailleurs ce qui leur a valu le nom de « Pigment 450 » (Omura et al., 1962; 1964).

Les CYPs sont des protéines globulaires partageant une structure commune conservée au cours de l'évolution (Graham et al., 1999). Elles sont composées de deux parties, un premier domaine riche en hélices α , et un second plus flexible constitué de feuillets β et de boucles, l'hème étant confiné au cœur de cette structure. Le groupement prosthétique est une fer-protoporphyrine dont le métal, coordonné à la chaîne polypeptidique par le thiolate d'une cystéine, permet la fixation de l'oxygène au cours du cycle catalytique. Les quatre atomes d'azote de l'hème lient également l'atome de fer. Dans la réaction type, le CYP fonctionnalise un substrat hydrophobe le plus souvent par ajout d'une fonction hydroxyle selon l'équation suivante :



La figure 2 présente le cycle catalytique consensus des CYPs (Mansuy et al., 1995). En absence de substrat, l'atome de fer est sous forme ferrique (1). La fixation du substrat entraîne un changement de conformation et permet à l'enzyme de devenir fonctionnelle (état 2). L'apport d'un électron par le système donneur d'électrons (NADPH-CYP réductase généralement) permet la réduction du fer ferrique en fer ferreux (3) et permet la fixation de l'oxygène (4). Un second électron apporté par la NADPH-CYP réductase ou le cytochrome b5 va initier l'étape de catalyse en formant l'entité peroxy-ferrique $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OO-}$ qui, par protonation, donnera le complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$ (5b). Une seconde protonation permet la libération d'une molécule d'eau par rupture de la liaison O-O et autorise le transfert de l'atome d'oxygène du complexe fer-oxo au substrat (6, 7). Dans certains cas, le cycle de catalyse peut suivre une voie non productive conduisant à un effondrement des intermédiaires oxydés et à une production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs). L'espèce oxy-ferrique (4) peut, par auto-oxydation revenir à l'état ferrique et cette transformation est accompagnée d'une production d'anion superoxyde. Ce phénomène peut également intervenir plus loin dans le cycle à partir des composés 5b et 6 et former respectivement du peroxyde d'hydrogène ou une molécule d'eau. La fréquence d'apparition de ces réactions secondaires est dépendante de nombreux paramètres cinétiques et thermodynamiques comme les vitesses de transfert d'électrons et de protons ou encore la nature du système donneur d'électron et le CYP concerné.

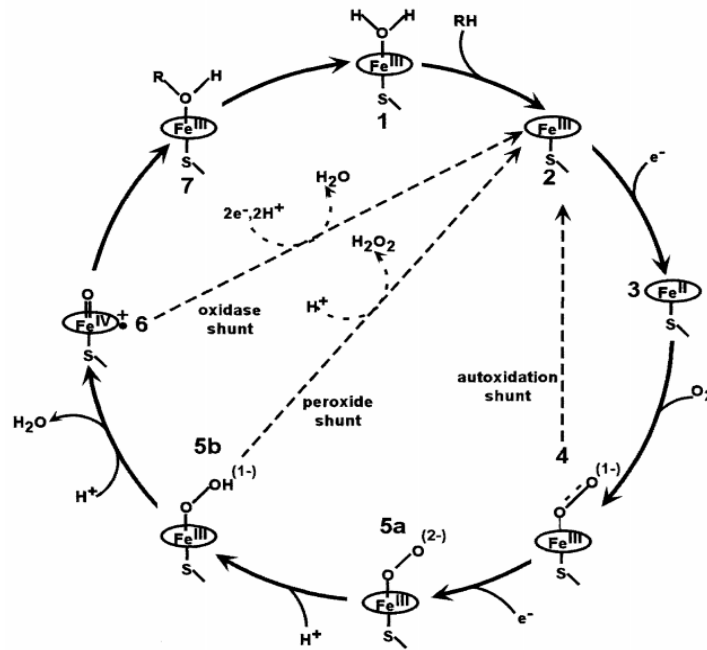


Figure 2 : Représentation schématique du cycle catalytique des CYPs

1.1.2. Nomenclature et classification

Aujourd'hui, plus de 21 000 séquences différentes sont identifiées dont au moins 6 000 dans le règne animal, ces chiffres continuent de croître chaque année (Nelson, 2009). Les CYPs font l'objet d'une classification internationale reposant sur l'hypothèse du gène ancestral des CYPs qui serait apparu il y a 3,5 milliards d'années chez les bactéries et qui permet de classer les CYP en fonction de leur homologie (Nelson, 1999; 1998).

La nomenclature est basée sur les règles suivantes : l'abréviation CYP pour « Cytochrome P450 » est suivie d'un nombre en chiffre arabe désignant la famille, puis d'une lettre désignant la sous-famille et enfin d'un nombre désignant le gène. Pour faire partie d'une même famille, les CYPs doivent présenter au moins 40% d'homologie entre leur séquence primaires en acides aminés. Pour faire partie d'une même sous-famille, il faut une homologie supérieure à 55%. Les CYPs présentant une divergence inférieure à 3% sont considérés comme variants alléliques. Chez l'Homme, 18 familles de CYPs et 44 sous-familles comportant 57 gènes et 58 pseudogènes ont été répertoriées <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>.

Deux méthodes alternatives de classement ont été proposées. La première, reposant sur la spécificité de substrat des CYPs, a montré ses limites car en réalité cette caractéristique n'est pas la règle générale puisqu'un même substrat peut être métabolisé par plusieurs CYPs.

La seconde méthode permet de subdiviser en quatre classes les CYPs en fonction de leur système donneur d'électrons. En effet, la réaction de monooxygénation catalysée par les CYPs requiert le couplage d'une source d'électrons dérivés du NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) à un système transporteur constitué de deux partenaires redox. La classe I inclut les CYPs bactériens et mitochondriaux utilisant le couple ferrédoxine réductase / ferrédoxine (Aguiar, Masse, and Gibbs 2005). La classe II est la plus commune chez les eucaryotes. Les CYPs de cette classe sont retrouvés au niveau du réticulum endoplasmique (RE) et impliquent la NADPH cytochrome réductase contenant les cofacteurs FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) et FMN (Flavine Mononucléotide). Le cytochrome b5 peut également intervenir comme système de transfert pour les enzymes de cette classe comme c'est le cas pour le CYP3A4 (Schenkman et al., 1999). La classe III représente les CYPs catalysant des réactions d'isomérisation ou de déshydratation et ne nécessitant pas l'apport d'électrons ou d'oxygène moléculaire (Aguiar, Masse, and Gibbs 2005). La classe IV n'a qu'un seul représentant : le CYPnor, qui catalyse la réduction du monoxyde d'azote en recevant ses électrons directement du NADH sans intermédiaire protéique. Initialement, cette classification comprenait 4 classes, mais en 2007, Hannemann et ses collaborateurs ont décliné 6 autres classes toujours basées sur le transfert d'électrons mais permettant un classement plus approprié des CYPs bactériens.

1.1.3. Implication des CYPs dans le métabolisme endogène

Les CYPs, jouent un rôle dans le métabolisme de nombreuses molécules endogènes. Ils sont impliqués dans la synthèse des acides biliaires (Del Castillo-Olivares et al., 2004) et des hormones stéroïdiennes à partir du cholestérol. La première étape commune à la biosynthèse de toutes les hormones stéroïdes est la conversion du cholestérol en prégénolone sous l'action d'un CYP mitochondrial, le CYP11A1. La synthèse se déroule ensuite dans le réticulum et fait intervenir les CYP17A1 et 21A1 avant de se terminer dans la mitochondrie par les CYPs de la sous-famille 11B (Hasler et al., 1999; Nebert et al. 1987). Ces

CYPs sont caractérisés par une importante spécificité tissulaire qui conditionne le lieu de production des différentes hormones stéroïdiennes. Ainsi, les glandes surrénales produisent de l'aldostérone, du cortisol et de la corticostérone, les testicules produisent de la testostérone et les ovaires sont responsables de la synthèse d'œstrogènes. Certains CYPs participent au catabolisme de ces hormones comme les CYP4A qui réalisent leur 6- β -hydroxylation.

Les CYPs de la sous-famille 4A sont impliqués dans l' ω -hydroxylation des acides gras et participent à leur dégradation (Johnson et al. 2002). Ils jouent également un rôle dans la bioactivation par hydroxylation de la vitamine D3 au niveau du RE (CYP2D25) et dans les mitochondries (CYP24, 27A1 et 27B1) (Araya et al. 2003). Enfin, ils participent aussi à la synthèse de l'acide rétinoïque en réalisant l'oxydation de son précurseur le rétinal (Ross et al., 2011; Zhang et al. 2000).

1.1.4. Métabolisme des substances exogènes

Les CYPs jouent un rôle aussi bien dans la détoxification que dans la bioactivation des xénobiotiques (Figure 3). Cette ambivalence est due notamment à la variabilité des réactions qu'ils catalysent. Parmi celles-ci, l'activité monooxygénase (hydroxylations aliphatiques ou aromatiques, N-hydroxylations, époxydations, etc.) peut aussi bien concerner les atomes de carbone comme les hétéroatomes (N, S, P). Nous pouvons également citer l'activité aromatasase jouant un rôle dans la conversion des androgènes en œstrogènes mais dont l'implication dans le métabolisme des xénobiotiques n'est pas démontrée (Guengerich 2007). Parmi les EMXs, les CYPs ont un rôle prépondérant dans la bioactivation des procarcinogènes. En effet, ces enzymes sont souvent responsables de la formation de métabolites réactifs vis-à-vis des macromolécules cellulaires comme l'ADN (Figure 3A) (Rendic et Guengerich 2012). En termes d'abondance, les CYP3A4, 2C, 1A1/2 et 2E1 sont majoritaires au niveau hépatique chez l'Homme (Guengerich 2006) et ce sont également ces CYPs qui sont impliqués dans la bioactivation de molécules procarcinogènes (figure 3B). De la même façon, ces isoformes sont majoritairement responsables du métabolisme de plus de 90% des médicaments et largement impliquées dans la production d'EROs au sein de la mitochondrie et du RE.

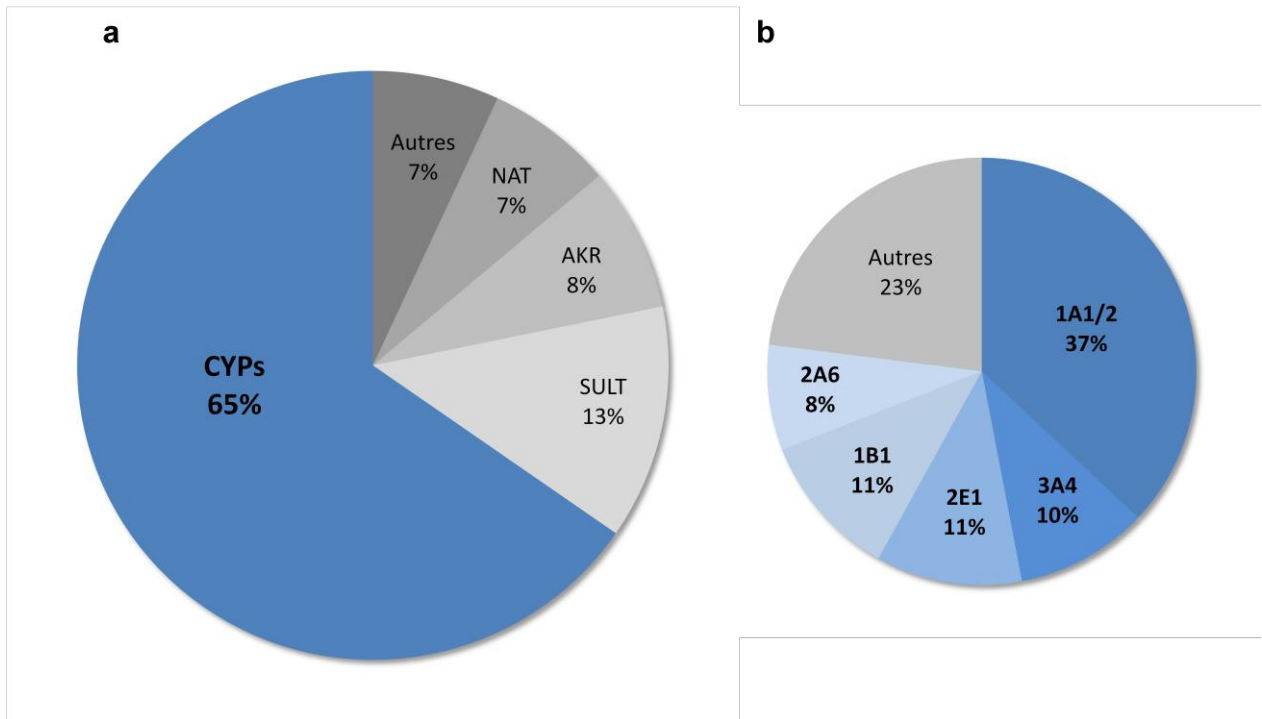


Figure 3 : Contribution des différentes EMX (A) et des différents CYPs (B) à l'activation métabolique des procarcinogènes (d'après Rendic et Guengerich 2012). (AKR, Aldo-kéto réductase ; NAT, N-Acétyltransférase ; SULT, Sulfotransférase)

1.1.5. Distribution

a. Localisation organotypique

Chez l'Homme, les CYPs se retrouvent dans tous les tissus hormis les muscles et les os. L'expression des CYPs impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques est élevée au niveau du foie, ensuite viennent les organes jouant un rôle de barrière comme la peau dont les kératinocytes, exprimant les CYP1A1, 1B1, 2B6, 2E1 et 3A4 (Jugert et al. 1994; Baron et al. 2001), l'intestin ou encore les poumons (cellules de Clara et pneumocytes de type II) (De Waziers et al. 1990; Krishna et al., 1994). Le foie est, de par son flux sanguin afférent en provenance du tractus gastro-intestinal et sa richesse en EMX, l'organe principal de détoxification. Certains CYPs, en raison de leur implication dans le métabolisme endogène comme la synthèse des hormones stéroïdiennes, sont exprimés préférentiellement dans certains organes ou tissus (cf. chapitre 1.1.3) (Seliskar et al., 2007; Hasler et al., 1987).

b. Zonation métabolique

Le lobule hépatique constitue l'unité fonctionnelle du foie (figure 4). La branche de l'artère hépatique permet l'apport en oxygène et la veine porte située à proximité permet aux nutriments et aux xénobiotiques de subir un premier passage hépatique. La création d'un gradient d'oxygène, d'hormones et de facteurs de croissance selon l'axe porto-central est permise par cette circulation centripète en direction de la veine efférente centrolobulaire. Ce phénomène semble être à l'origine de la zonation métabolique et permet d'expliquer comment des fonctions, à priori opposées comme la glycolyse et la néoglucogenèse, peuvent cohabiter au sein d'un même organe (Jungermann et al., 2000; Jones et al., 1996). Ainsi, le microenvironnement de l'hépatocyte évoluant selon l'axe porto-central conditionne partiellement ses fonctions métaboliques.

Par exemple, les monooxygénases impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques comme le CYP2E1 et le CYP1A2 sont exprimées préférentiellement au sein des hépatocytes centrolobulaires (Ratanasavanh et al. 1991). Cette population possède également une capacité de prolifération supérieure aux hépatocytes périlobulaires. La zonation de ces capacités d'activation métabolique et de détoxification apporte une explication quant à l'étiologie des lésions localisées induites par certains xénobiotiques. C'est le cas du paracétamol, responsable de lésions centrolobulaires induites par la production de N-acétyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI) par le CYP2E1 (Anundi et al. 1993). Il existe peu d'exemples concernant les hépatocytes périlobulaires à l'exception de celui de l'alcool allylique et de ses dérivés qui sont métabolisés en acroléine par l'alcool déshydrogénase (ADH). Cependant, cette toxicité n'est pas due à une zonation de l'ADH puisque celle-ci semble être exprimée de manière homogène selon l'axe porto-central. Ce n'est pas le cas des enzymes de phase II qui pourraient jouer un rôle dans ce phénomène. Toutefois, la principale explication réside dans le fait que la prise en charge de l'alcool allylique est très rapide au sein des hépatocytes. Ainsi, lors du premier passage hépatique et même avec des doses élevées, la quasi-totalité du métabolisme est réalisée au sein des populations périportales, ce qui limite l'exposition des hépatocytes centrolobulaires (Sasse et al., 1991).

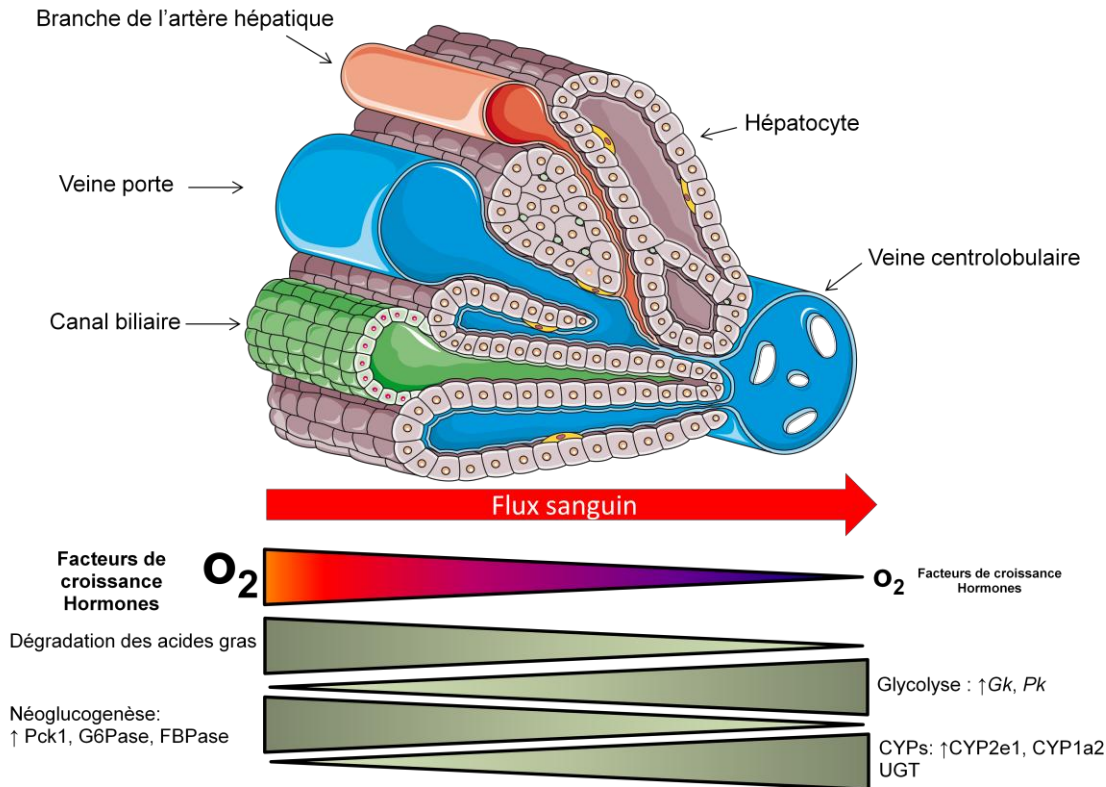


Figure 4 : Zonation des différents processus métaboliques au sein des sous-populations hépatocytaires selon l'axe porto-central du lobule hépatocyttaire. Le lobule hépatique, de structure hexagonale, est l'unité structurale et fonctionnelle du foie. Au centre de chaque lobule, se trouve la veine efférente centrolobulaire. En périphérie du lobule se trouvent deux vaisseaux afférents, une branche de la veine porte et une branche de l'artère hépatique, qui permettent la circulation centripète par les capillaires sinusoides, caractéristique du lobule hépatique. Ils constituent avec le canal biliaire, la triade portale. Ce flux artérioveineux-veineux centripète permet la formation d'un gradient d'O₂ et de facteurs de croissance impliqués dans la spécialisation des populations hépatocytaires selon l'axe porto-central. Les enzymes de la néoglucogénèse telles que la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), la glucose-6-phosphatase (G6P) ou la fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) sont fortement exprimées en zone périportale. A l'inverse, les enzymes de la glycolyse telles que la glucokinase (Gk) et la pyruvate kinase (Pk) sont exprimées préférentiellement en zone centrolobulaire (Braeuning et al. 2006; Oinonen et al., 1998).

c. Synthèse et adressage aux organites

Il est aujourd'hui établi que les CYPs sont des protéines membranaires localisées principalement au sein de la membrane du réticulum endoplasmique. Plusieurs études ont également mis en évidence la présence de certaines isoformes au sein d'autres organites dérivant du RE (appareil de Golgi, lysosomes, membrane plasmique) ainsi que dans la

mitochondrie (Ronis et al. 1991; Pahan et al. 1997; Loeper et al. 1990; M. A. Robin et al. 1995).

La rétention ou l'adressage des CYPs au RE ou à la mitochondrie est permis par la présence d'une séquence spécifique en N-terminal. (figure 5) (Bar-Nun et al. 1980; Sakaguchi et al. 1992; Sakaguchi et al. 1984; Neve et al., 2008). Cette séquence de taille variable allant de 10 à 80 acides aminés est constituée d'une région riche en résidus leucine hydrophobes qui permet l'adressage au RE et l'enchâssement du CYP dans la membrane. La seconde région dite cryptique, est riche en résidus chargés positivement (arginine, lysine) et doit permettre l'adressage à la mitochondrie. La région riche en proline quant à elle, contribue à l'arrangement topologique correct du site catalytique vis-à-vis du cytoplasme (Sato et al. 1990; Kusano et al. 2001). L'exposition du signal d'adressage à la mitochondrie peut se faire selon deux modalités : dans un cas, la séquence d'adressage au réticulum est clivée par une endoprotéase Ser permettant d'exposer le signal mitochondrial ; dans l'autre cas, c'est une phosphorylation de la protéine qui permet un réarrangement conformationnel comme dans le cas du CYP2E1 sur la sérine 129 (Neve et al., 1999; Addya et al. 1997; Anandatheerthavarada et al. 1999).

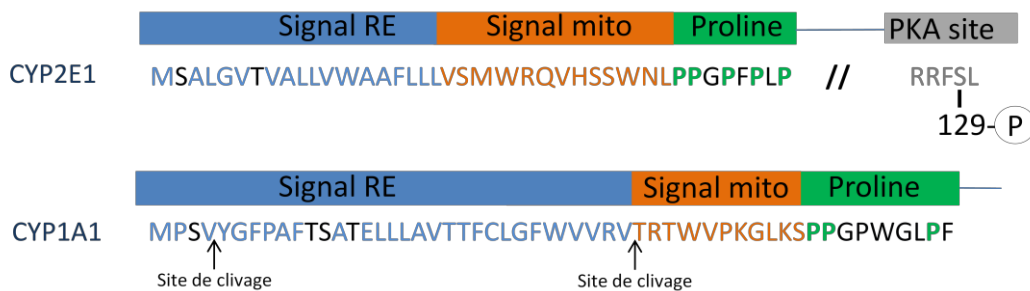


Figure 5 : Organisation des séquences d'adressage des CYP2E1 et 1A1 au réticulum endoplasmique et à la mitochondrie. L'exposition du signal d'adressage mitochondrial est permise par phosphorylation de la sérine 129 dans le cas du CYP2E1 ou par clivage protéolytique de 4 à 32 acides aminés dans la partie N-terminale du CYP1A1.

➤ Adressage des CYPs au réticulum endoplasmique

Les CYPs sont traduits dans le cytosol sur des ribosomes libres (figure 6 (1)). Dès l'émergence de la partie N-terminale, la traduction est stoppée jusqu'à la fixation de la protéine de reconnaissance du signal (SRP) (2). Le complexe formé va ensuite se fixer sur le récepteur de la SRP situé sur la membrane du RE (3) et permettre la reprise de la traduction et la libération de la SRP (4). Après la synthèse des premiers résidus hydrophobes, la traduction s'arrête temporairement pour permettre au complexe de translocation SEC61 (ou translocon) d'intégrer la partie N-terminale naissante du CYP. La traduction se termine, laissant la protéine enchâssée au sein de la membrane du réticulum. Les mécanismes permettant la rétention ou le recyclage des CYPs au sein du RE sont encore mal connus. En effet, à l'exception du CYP51 chez la levure possédant un motif spécifique (KKXX) permettant sa séquestration par un mécanisme dédié (Homma et al., 2000), aucun motif de rétention n'a été identifié chez les CYPs. Une hypothèse impliquant la formation de complexes oligomériques pouvant empêcher le transport et la maturation vers le Golgi a été évoquée. De même, il semble que la partie N-terminale puisse jouer un rôle dans la rétention directe de certains CYPs comme le 2C1, 2C2 et le 2C11 ou qu'elle intervienne dans un mécanisme de recyclage de la protéine au niveau d'un compartiment intermédiaire du Golgi (Szczesna-Skorupa et al., 2000; Ahn, Szczesna-Skorupa et al., 1993).

➤ Adressage des CYPs à la mitochondrie

Comme nous l'avons évoqué, il existe deux voies permettant d'activer le signal cryptique d'adressage à la mitochondrie. Dans le cas du CYP1A1, c'est un clivage réalisé par une endoprotéase cytosolique peu décrite de la famille Ser qui élimine entre 4 et 32 acides aminés en N-terminal et expose le signal d'adressage (Boopathi et al. 2008; Addya et al. 1997). Pour les CYP2E1 et 2B1, c'est une phosphorylation par la protéine kinase A d'un résidu sérine situé respectivement en position 129 et 128 qui permet de révéler le signal cryptique tout en conservant l'intégrité des protéines (Anandatheerthavarada et al. 1999; Robin et al. 2002). Ce mécanisme s'applique également au CYP2D6 qui, en plus de posséder un site consensus en position 135, possède deux sites Ser148 et Ser217 reconnus par la protéine kinase A (Sangar et al. 2009). Il a également été démontré que la phosphorylation diminue l'affinité de la chaperonne SRP et par conséquent l'adressage au réticulum. A l'inverse, le rajout par mutagenèse dirigée de résidus hydrophobes au sein la séquence

d'adressage au RE augmentera l'affinité pour la SRP et donc l'adressage au RE (Anandatheerthavarada et al. 1999; Robin et al. 2002; Robin et al. 2001).

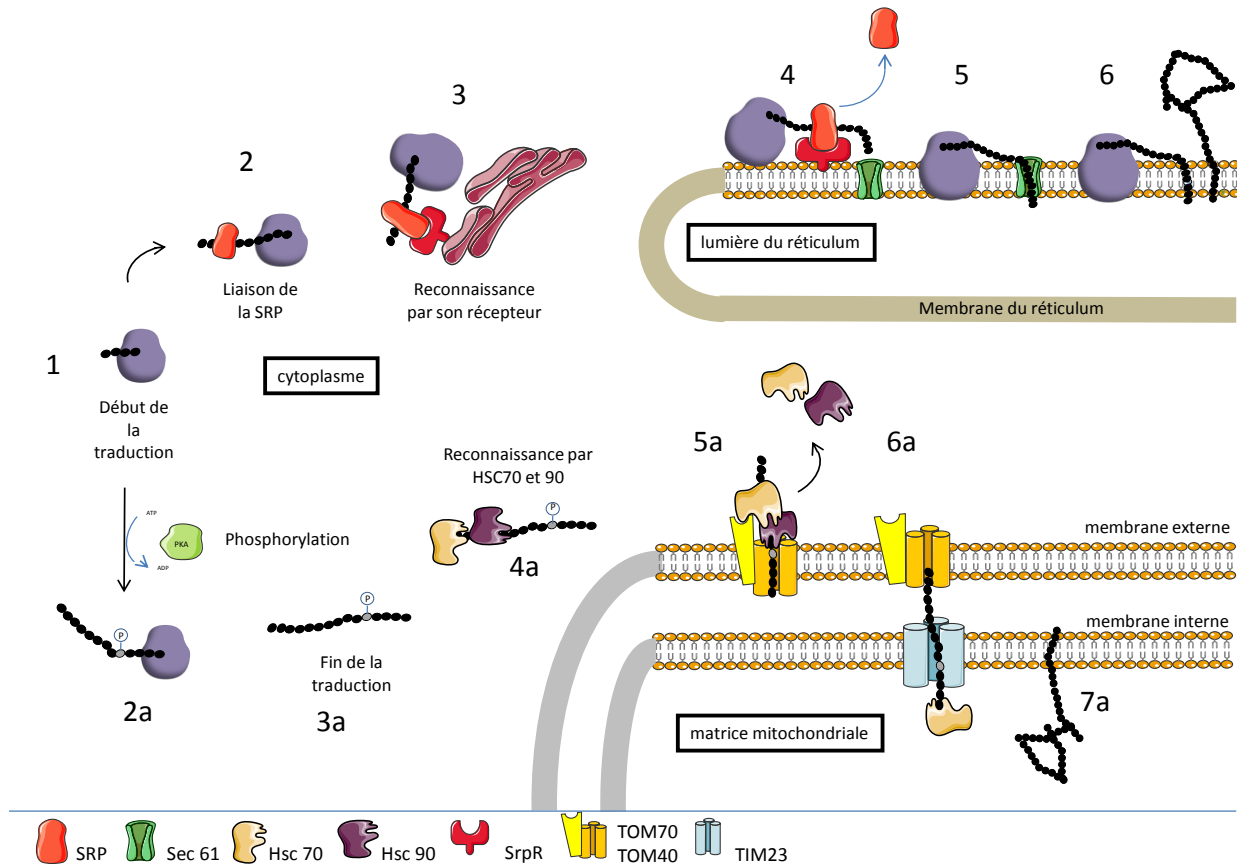


Figure 6 : Adressage co-traductionnel des CYPs à la mitochondrie et au réticulum endoplasmique. Deux voies d'adressage sont possibles lors de la traduction. Le choix est conditionné par la fixation de la SRP et la phosphorylation du peptide qui permet l'exposition du signal cryptique d'adressage mitochondrial.

La figure 6 représente le mécanisme d'adressage communément accepté et partagé par les CYP2E1, 2B1 et 2D6. La traduction est initiée par un ribosome libre dans le cytosol (1). En fonction du statut cellulaire en AMPc et de la nature du CYP, l'affinité du peptide naissant pour la SRP est variable et une fraction plus ou moins importante peut être phosphorylée par les protéines kinases A et C (2a). Cette phosphorylation diminue l'affinité de la SRP et permet à la traduction de se terminer dans le cytoplasme. Les protéines chaperonnes (HSC 70 et 90) vont ensuite prendre en charge les CYPs nouvellement traduits pour les adresser à la mitochondrie (3a et 4a). Dans le cas du CYP1A1 clivé de 33 résidus (+33 / CYP1A1) et du

CYP2B1, aucune des translocases de la membrane externe de la mitochondrie (TOM 20, 22, 40, 70) ne semble impliquée dans sa translocation. A l'inverse, pour le CYP2E1 et le +5 / CYP1A1, les protéines TOM 70 et 40 sont impliquées (Anandatheerthavarada et al., 2009). Une fois la protéine fixée sur le complexe TOM, les protéines chaperonnes sont libérées (5a) et la protéine est transloquée dans la matrice mitochondriale grâce au potentiel de membrane et aux translocases de la membrane interne (TIM) (6a). Le signal d'adressage est clivé par une endoprotéase de la matrice mitochondriale et des protéines chaperonnes permettent le repliement correct de l'enzyme (7a). Ce réarrangement conformationnel implique l'utilisation de l'adrénodoxine et de la NADPH adrénodoxine réductase comme source d'électrons.

La dégradation des protéines peut se faire selon deux voies. La voie lysosomale, mineure et aspécifique, qui dans le cas des enzymes liées au réticulum, implique un mécanisme d'autophagie avant la fusion avec le lysosome (Mijaljica et al., 2006). Le second mécanisme, ATP-dépendant, fait intervenir le protéasome et, selon les cas, l'ubiquitinylation des protéines (Glickman et al., 2002). Dans le cas des CYPs, des demi-vies allant de 5 à 37 heures ont été rapportées, cette variabilité reflète l'implication des deux voies de dégradation (Correia 2003). Selon les conditions, les CYPs peuvent subir une dégradation lente dépendante du lysosome ou à l'inverse, être dégradés rapidement après adressage au protéasome. Il a été démontré pour le CYP2E1 que la phosphorylation de la Ser129 lors de la traduction favorisait l'adressage mitochondrial. Mais, lorsque cette modification a lieu après son intégration au sein du réticulum, elle favorise l'ubiquitinylation et la dégradation par la voie du protéasome (Anandatheerthavarada et al. 1999; Robin et al. 2002).

1.1.6. Régulation

Les CYPs jouent un rôle majeur dans la biotransformation de la plupart des médicaments. C'est pourquoi la compréhension des facteurs impliqués dans la variabilité de leur expression et de leur activité constitue un enjeu essentiel et forme à elle seule une discipline, la pharmacogénétique. En effet, elle doit permettre l'adaptation des traitements dont l'index thérapeutique est étroit ou modifié par des conditions physiopathologiques

particulières, ou encore de prédire les risques d'interactions médicamenteuses et de prévenir les risques de surdose et d'échec thérapeutique.

Cette réponse adaptative qui est d'un point de vue toxicologique, un moyen pour l'organisme de se prémunir des effets des xénobiotiques, est finement contrôlée. Il existe plusieurs niveaux de régulation : transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel. En premier lieu, nous aborderons les facteurs génétiques et physiopathologiques impliqués dans cette variabilité, puis les mécanismes permettant cette régulation seront présentés.

a. Facteurs physiopathologiques

De nombreux paramètres physiologiques tels que le poids, la distribution des graisses et l'expression des EMXs sont différenciellement modulés chez les individus mâles et femelles (Beierle et al., 1999). Cet effet est bien connu chez l'animal de laboratoire mais il est également démontré chez l'Homme (Beierle et al., 1999; Waxman et al., 2009). Zhang et al. (2011) ont présenté une étude transcriptomique basée sur des biopsies hépatiques issues d'hommes et de femmes. Celle-ci a démontré qu'il existe un différentiel d'expression entre les sexes pour au moins 40 gènes des EMXs. Parmi ces gènes, figuraient le *CYP3A4*, le *CYP1A2*, le *CYP2B15* et l'*UGT2B15*. Plusieurs études ont montré que le transcrite du *CYP3A4* ainsi que la protéine sont plus fortement exprimés chez la femme.

L'âge est également un facteur influent, par exemple, au stade foetal et post-natal, l'expression des CYPs varie substantiellement en comparaison de l'adulte (Stevens 2006; Stevens et al. 2008). De même, il existe des différences chez l'individu âgé, qui semblent cependant plutôt liées à des facteurs extrinsèques comme la polymédication, fréquente à cette étape de la vie, ainsi qu'à la clairance rénale déclinante plutôt qu'à l'âge en lui-même. De plus, il est difficile de dissocier les effets de l'âge de ceux du genre (Cotreau et al. 2005; Yang et al. 2010).

Lorsque le statut inflammatoire est modifié, comme cela est le cas lors d'épisodes infectieux ou de cancers, les cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- α , etc.) libérées répriment l'expression transcriptionnelle de nombreuses EMXs (Slaviero et al. 2003; Abdel-Razzak et al. 1993). La régulation des EMXs dans un contexte pathologique sera rediscutée dans le chapitre suivant. De même, l'hypoxie, importante dans les situations d'interventions

chirurgicales ou lors de pathologies hépatiques telles que la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire, réprime de nombreuses enzymes de biotransformation dont le CYP3A4 (Legendre et al. 2009).

b. Facteurs génétiques et épigénétiques

Le polymorphisme peut avoir des conséquences variables allant d'un gain de fonction à une perte complète de celle-ci. Dans le cas des EMXs, le gain de fonction résulte le plus souvent d'une augmentation du nombre de copies du gène, d'une augmentation de l'activité de son promoteur ou d'un SNP (Single Nucleotide Polymorphism) conduisant à la modification de sa séquence protéique permettant une activité enzymatique plus rapide. Les pertes de fonction quant à elles, résultent en général de SNP conduisant à un mauvais épissage du CYP, à une instabilité du messager ou à une diminution de sa traductibilité (Sadec et al. 2011).

Lors d'une transplantation, la prescription d'immunosuppresseurs est inévitable. Parmi eux, le tacrolimus, un macrolide capable d'inhiber la transduction du signal dans le lymphocyte est largement utilisé. Celui-ci est métabolisé par le CYP3A5 exprimé dans le foie et l'intestin et pour lequel il existe un SNP modulant son expression. Ainsi, l'allèle *CYP3A5*1* conduit à l'expression de la protéine fonctionnelle alors que la *CYP3A5*3* est responsable d'un épissage défectueux. La combinaison de ces deux allèles peut conduire à l'expression d'au moins 3 phénotypes différents : les métaboliseurs rapides homozygotes pour le *CYP3A5*1*, les intermédiaires hétérozygotes et les métaboliseurs lents, homozygotes pour le *CYP3A5*3*. Lors d'une greffe hépatique, les différences de métabolisme sont plus subtiles puisque les génotypes du receveur et du foie du donneur interviennent dans la biotransformation du tacrolimus.

Le protocole de prise en charge actuel prévoit une adaptation de la dose de tacrolimus a posteriori, 7 jours après la transplantation. Ce délai est critique pour le risque de rejet mais indispensable pour déterminer le profil du patient. A Rennes, une étude clinique en cours nommée CYPTAC'H a pour objectif de déterminer l'impact du polymorphisme génétique du CYP3A5 du donneur et du receveur sur le métabolisme du tacrolimus. A long terme, l'objectif est de pouvoir déterminer la dose thérapeutique efficace a priori par génotypage du donneur et du receveur et ainsi de s'affranchir du délai critique de 7 jours.

Parmi les facteurs épigénétiques impliqués, les miARNs peuvent être responsables d'une répression directe de l'expression de l'enzyme comme c'est le cas avec miR-27b reconnaissant l'ARN du CYP3A4, ou le miR148-a ciblant le récepteur nucléaire PXR, avec pour conséquence une modulation des niveaux d'expression des CYP3A4 et 2B6 (Pan et al., 2009; Takagi et al. 2008). Par ailleurs, la méthylation des îlots CpG des promoteurs influence également l'expression de certains CYPs comme le CYP1A2 pour lequel une corrélation inverse entre l'expression du transcrite et le degré de méthylation des îlots proches du codon start a été observée (Ghotbi et al. 2009).

c. Régulation transcriptionnelle

La réponse adaptative aux xénobiotiques est en grande partie orchestrée par des facteurs de transcription de la superfamille des récepteurs nucléaires (RNs). Ces protéines possèdent deux structures essentielles. La première est un domaine de reconnaissance à l'ADN (DBD), riche en cystéines et très conservé au cours de l'évolution. Celui-ci permet la reconnaissance de sites consensus situés au sein des régions promotrices des gènes cibles. La seconde structure est un site de liaison au ligand (LBD), permettant l'interaction avec les xénobiotiques et les hormones. Les LBDs, très flexibles en taille et en forme, peuvent fixer un grand nombre de ligands différents (Olefsky 2001).

Basé sur la présence du domaine riche en cystéines très conservé du DBD, un autre groupe de RNs partageant les mêmes caractéristiques structurelles a été découvert mais n'ayant pas de ligand connu, ils sont classés sous le nom de récepteurs orphelins. Dans ce chapitre, nous nous focaliserons uniquement sur les principaux récepteurs impliqués dans la régulation des EMXs en incluant les enzymes de phase I et II ainsi que les transporteurs.

➤ Le récepteur PXR NR1I2

Le récepteur PXR (Pregnane X Receptor) fait partie des RNs activés par la fixation de ligand et est exprimé majoritairement dans le foie et l'intestin (Kliwer et al., 2002). Celui-ci est présent dans le cytosol et forme un complexe multiprotéique incluant la chaperonne Hsp90 et la protéine de rétention cytoplasmique CCRP. Lors de la fixation d'un ligand, la dissociation du complexe permet la translocation nucléaire du RN et son hétérodimérisation avec RXR α . Ce complexe se fixe ensuite sur les régions promotrices des gènes cibles et en induit l'expression. Plusieurs cofacteurs peuvent venir se rajouter au complexe et permettre

l'amplification de l'induction comme les co-activateurs de la famille p160, la protéine de liaison à PPAR ou encore PGC1- α (Squires, Sueyoshi, and Negishi 2004; Xunshan Ding and Staudinger 2005). A l'inverse, des co-répresseurs peuvent également intervenir sur le complexe pour en inhiber l'activité (Orans et al., 2005). La reconnaissance de PXR par les différents cofacteurs est contrôlée par son degré de phosphorylation. Ces cofacteurs permettent la régulation fine des modulations contrôlées par PXR et expliquent également la grande variabilité de réponse observée entre différents tissus.

Parmi les CYPs modulés par PXR, figurent les CYPs 3A, 2B et 2C (Takeshita et al. 2002; Goodwin et al., 1999). L'analyse des régions promotrices de ces CYPs a démontré la présence de répétitions directes (DR-3, DR-4) et inversées (ER-6, ER-8) dérivant d'un motif consensus (TGAACT) permettant la fixation de PXR (Kliwer, Goodwin, and Willson 2002). PXR régule également certaines enzymes de phase II comme les UGTs, les SULTs et les GSTs ainsi que certains transporteurs comme la glycoprotéine P et le transporteur OATP2 (Organic anion transporter family member 2)

➤ Le récepteur CAR NR1I3

Le récepteur CAR (Constitutive Androstane Receptor) est très similaire de PXR et est exprimé essentiellement dans le foie et l'intestin (Swales and Negishi 2004). Ce RN partage avec PXR un grand nombre de ligands, ainsi que sa capacité de liaison aux éléments de réponses au sein des séquences promotrices des gènes cibles. Cette redondance fonctionnelle explique pourquoi un grand nombre d'EMXs tels que les CYPs, les UGTs, les GSTs, les SULTs ainsi que les transporteurs membranaires peuvent être co-régulés par ces deux récepteurs (Falkner et al. 2001; Burk et al. 2005; Sugatani et al. 2001; Sueyoshi et al. 1999a; Ferguson et al. 2002; Runge-Morris et al. 1998).

En revanche, le mécanisme d'activation de CAR diffère de PXR. En effet, sa fixation sur les séquences XRE (Xenobiotic Responsive Element) nécessite toujours son hétérodimérisation avec RXR α , mais le mécanisme permettant la translocation nucléaire diffère. Il semble, dans le cas de CAR, que cette activation dépende plus fréquemment de mécanismes indirects impliquant le complexe protéique de rétention dans le cytoplasme, que de mécanismes d'interaction directe ligand-récepteur (Li et al., 2010). S'il existe de nombreux xénobiotiques capables d'induire CAR, peu d'entre eux fonctionnent par interaction directe. Le

phénobarbital, inducteur classique de CAR, agit indirectement en induisant la déphosphorylation de la thréonine 38. Cet événement déstabilise le complexe multiprotéique et permet la translocation nucléaire de CAR pour former un dimère avec RXR α (Moore et al. 2000; Swales et al., 2004). Cet hétérodimère se fixe sur l'élément de réponse PBREM (Phenobarbital-Responsive Enhancer Module) constitué de deux sites de fixation de facteurs nucléaires RNs (NF1 et NF2) et de deux sites de fixation des RNs (NR1 et NR2). Ces derniers contiennent chacun des répétitions directes (DR-4) (Honkakoski et al. 1998). L'élément de réponse PBREM est retrouvé sur le promoteur du *CYP2B6*. A l'inverse, la metformine est capable de bloquer cette induction par le phénobarbital en favorisant la phosphorylation de la thréonine 38 (Yang et al., 2014). Seul le CITCO (6-(4-Chlorophenyl)imidazo(2,1-b)[1,3]thiazole-5-carbaldehyde O-(3,4-dichlorobenzyl)oxime) a été identifié comme inducteur direct de CAR, à l'inverse certains ligands peuvent avoir un effet antagoniste comme c'est le cas du clotrimazole.

➤ Le récepteur AhR

Le récepteur AhR (Aryl hydrocarbon receptor) ne fait pas partie des RNs mais c'est un récepteur aux xénobiotiques faisant partie de la famille des protéines PER-ARNT-SIM (PERiod circadian protein ; Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator protein ; Single-Minded protein) . Il intervient dans la régulation des UGTs et des CYPs de la famille 1A, ces derniers étant impliqués dans le métabolisme des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Ces contaminants ainsi que leurs analogues halogénés sont de puissants inducteurs de ce récepteur. Son mécanisme d'action est similaire à CAR et PXR : en absence de ligand, AhR est séquestré dans le cytoplasme par des protéines chaperonnes (Hsp90, p23 et AIP1). La fixation d'un ligand permet la translocation dans le noyau et la formation d'un hétérodimère avec l'ARNT (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator). Ce complexe se fixe ensuite sur les éléments de réponse DRE (Dioxin-Responsive Elements) situés sur les séquences promotrices des gènes cibles. Indépendamment de cette régulation par les ligands exogènes, il a été démontré qu'une élévation intracellulaire d'AMPc conduit à la translocation nucléaire d'AhR et permet la fixation directe d'AhR sur le promoteur du *cyp1A1* contenant le motif de liaison AhR/ARNT (5'-GCGTG-3') et en induit l'expression. Si isolément ce mécanisme est inducteur, il peut, comme cela a été démontré avec la dioxine, réprimer partiellement l'induction du CYP1A1 (Oesch-Bartlomowicz et al. 2005).

➤ Les récepteurs PPARs NR1C2

Les récepteurs PPARs (Peroxisome proliferator-Activated Receptors) sont des facteurs de transcription ligand dépendant. Constitués de 3 membres nommés α , β/δ et γ , ils diffèrent les uns des autres par la nature de leurs ligands et leurs gènes cibles. Parmi eux, PPAR α est le plus impliqué dans la régulation des EMXs. Celui-ci est fortement exprimé dans les cellules réalisant l'oxydation des acides gras comme les hépatocytes. Par homologie aux autres récepteurs nucléaires, les PPARs se fixent au PPRE (Peroxisome Proliferator Response Element) des gènes cibles sous forme d'hétérodimère avec RXR pour en moduler l'expression. En plus de son interaction avec le ligand et selon le contexte cellulaire, l'activité des PPARs peut être modulée positivement ou négativement par un nombre important de cofacteurs. Plusieurs études montrent que PPAR α est impliqué dans la régulation du CYP3A4, des UGTs de la famille 2B ainsi que des transporteurs MDR2 et MRP3 (Barbier et al. 2003; Thomas et al. 2013). Cependant, son rôle semble secondaire en regard des RNs précédents

➤ Intérêt pharmacologique des récepteurs nucléaires

Si la modulation de clairance médiée par les RNs en réponse aux xénobiotiques peut être bénéfique en favorisant l'élimination rapide de certains contaminants, elle n'en demeure pas moins problématique dans de nombreuses circonstances. En effet, en plus de la toxicité pouvant résulter de la surexpression des CYPs, les RNs sont responsables de la modulation de nombreux autres gènes et peuvent être à l'origine de désordres métaboliques ou immunologiques, d'un dépassement de l'intervalle thérapeutique, ou encore d'une perte d'efficacité des médicaments.

Par exemple, l'activation de PXR et de PPAR α induit l'expression d'enzymes lipogéniques telles que l'acide gras synthase, l'élongase des acides gras à longue chaîne ainsi que certains transporteurs comme CD36 et ABCG1 (Zhang et al. 2013; Zhou et al. 2008). Ces enzymes permettent l'accumulation des triglycérides au niveau hépatique et à terme, conduisent à une stéatose.

L'exposition chronique aux activateurs de PXR, tels que la rifampicine, réprime le facteur NF- κ B impliqué dans la réponse immune et l'inflammation et favorise l'apparition d'une immunosuppression (Wahli, 2008).

L'induction de transporteurs comme la P-gp et MRP2 par PXR augmente l'efflux de la barrière hémato-encéphalique réduisant l'efficacité des médicaments du système nerveux central (Bauer et al., 2006; Lombardo et al., 2008).

A l'inverse, l'altération du métabolisme de certains médicaments peut être dangereuse à cause de la production et de l'accumulation de métabolites toxiques. Par exemple, le paracétamol, un analgésique très largement utilisé qui est métabolisé au niveau hépatique en glucuronide et en sulfoconjugué qui sont des métabolites peu toxiques. Il existe cependant une voie mineure impliquant les CYPs et responsable de la génération d'un époxyde, le *N*-acetyl-*p*-benzo-quinone imine (NAPQI). Aux doses thérapeutiques, le NAPQI est rapidement détoxifié sous forme de conjugué au glutathion, néanmoins, lorsque les CYPs sont induits et lorsque le stock de glutathion est limité, le paracétamol peut induire une toxicité hépatique résultant de l'accumulation de NAPQI. L'hépatotoxicité du paracétamol est observée chez l'Homme lors de co-administration avec l'isoniazide, un médicament inducteur du CYP2E1 (Manyike et al., 2000; Sinclair et al., 1998).

Plusieurs molécules utilisées en chimiothérapie telles que le taxol, le cyclophosphamide et le tamoxifène ont été identifiées comme ligands de PXR chez l'Homme, et les enzymes de phase I et II ainsi que les transporteurs d'efflux impliqués dans l'apparition de résistances sont codés par des gènes cibles de ce récepteur tels que *ABCB1*, *MRP*, *CYP3A*, *UGT* et *GST* (Harmsen et al., 2007). PXR induit donc une batterie de gènes favorisant l'élimination des anti-cancéreux et permet le développement d'une résistance telle que cela a été démontré dans les cancers du sein et de la prostate (Qiao et al., 2014; Y. Chen et al., 2007).

Comme ces exemples l'illustrent, la littérature contient de multiples exemples où les RNs sont impliqués dans l'apparition d'effets secondaires et d'interactions médicamenteuses. S'il est nécessaire dans le développement précoce d'une molécule de déterminer son effet vis-à-vis des RNs pour prévenir ces phénomènes, le développement d'agonistes ou d'antagonistes de ces récepteurs est tout aussi important.

Le récepteur aux xénobiotiques Ahr est exprimé dans de nombreux types de tumeurs (Safe et al., 2013) où il peut jouer un rôle anti ou pro-oncogène en fonction du tissu concerné.

Cela met en exergue l'intérêt du ciblage des RNs et de AhR, dans le développement des substances anti-cancéreuses.

1.1.7. Le CYP2E1

Long de 10 kb et contenant 9 exons, le gène humain du CYP2E1 situé sur le chromosome 10 en position 10q24.3 code une protéine de 493 acides aminés (Umeno et al. 1988). Le CYP2E1 est principalement exprimé dans le foie et est impliqué dans le métabolisme de nombreuses molécules d'intérêt toxicologique comme l'éthanol, le paracétamol, le CCl₄ ainsi que les nitrosamines. Il est également impliqué dans le métabolisme de molécules endogènes comme l'acétone, le glycérol et les acides gras (Laethem et al., 1993; Song et al., 1996; Gonzalez et al., 2005). Le cycle catalytique de ce CYP est remarquable car les voies secondaires non productives (cf. chapitre I) sont particulièrement actives et sont responsables de la libération d'EROs pouvant induire des dommages mitochondriaux, des altérations de l'ADN et une peroxydation lipidique. Cumulées, ces altérations peuvent conduire à la mort cellulaire par apoptose (Cahill et al., 2002; Demeilliers et al., 2002; Cederbaum, 2006; Butura et al., 2009).

La variabilité interindividuelle de l'activité du CYP2E1 très élevée observée chez l'Homme s'explique non seulement par l'existence d'un polymorphisme important mais également par la diversité des mécanismes de régulation d'expression impliqués (Lieber 1999). En effet, le CYP2E1 fait figure d'exception puisqu'à l'inverse des autres CYPs préférentiellement régulés au niveau transcriptionnel, celui-ci est finement contrôlé au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel, mais aussi traductionnel et post-traductionnel (Aguiar et al. 2005; Ingelman-Sundberg et al. 1994; Novak et al., 2000).

a. Polymorphisme génétique et régulation physiopathologique du CYP2E1

Les SNPs sont nombreux au sein du *CYP2E1* (Lieber, 1999). Parmi les plus notables, l'allèle *CYP2E1*5B* est associé à un niveau d'activité transcriptionnelle élevé et semble constituer un facteur de risque dans le développement de cirrhose alcoolique, en particulier dans certaines ethnies où le polymorphisme *ALDH*2* de l'aldéhyde déshydrogénase est fréquent (Crabb et al., 1989; Quiñones et al., 1999). L'allèle *CYP2E1*5B* est défini par deux polymorphismes *Pst1* et *Rsa1*, ce dernier est une substitution *C/T* en -1019 au sein du site de

fixation du facteur de transcription HNF-1 α dans la région promotrice du gène du CYP2E1 (Watanabe et al., 1994). Ce facteur de transcription est impliqué dans une régulation négative induite par les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF α (Abdel-Razzak et al., 1993). La présence de RsaI abolit cette régulation, conduisant à la surexpression du CYP2E1 en contexte inflammatoire. L'allèle *CYP2E1*1D* conduit également à des différences d'inductibilité du CYP2E1 et semble être impliqué dans la dépendance à l'alcool et à la nicotine (Howard et al., 2003; McCarver et al., 1998). L'IL-4 est une cytokine anti-inflammatoire qui régule négativement la plupart des CYPs à l'exception des GST α et du CYP2E1 pour lequel le transcrit et la protéine ont été retrouvés augmentés dans des hépatocytes humains en culture primaire et d'hépatome (Lagadic-Gossmann et al. 2000; Langouet et al. 1995). Deux voies de signalisation distinctes sont impliquées dans ce mécanisme, la voie JAK-STAT et la voie IRS1/2 (Wang et al., 2010). La voie Wnt est également impliquée dans la régulation transcriptionnelle de ce CYP mais le mécanisme reste encore à déterminer (Gerbal-chaloin et al. 2014).

Le CYP2E1 est induit dans de nombreux contextes physiopathologiques tels que le diabète de type 2, l'obésité ou encore le jeûne (Dong et al., 1988; O'Shea et al., 1994; Raucy et al., 1991). Si initialement cette induction était attribuée à la cétogenèse (Dong et al. 1988), il semblerait, selon les travaux de Woodcroft et al., (2002) réalisés sur des animaux diabétiques, que l'augmentation du taux de transcrit CYP2E1 résulte d'une altération d'une voie de signalisation de l'insuline, cette hormone diminuerait la stabilité du transcrit en conditions non pathologiques, par un mécanisme impliquant une séquence de 16 nucléotides située en 5' de l'ARNm (Moncion et al. 2002). Shukla et al. (2013) ont mis en évidence l'implication de plusieurs miARNs dans la régulation du CYP2E1 par l'insuline, impliquant les voies de signalisation PI3-Kinase et Akt/mTOR dans les hépatocytes de rat. L'insulino-résistance pourrait donc jouer un rôle important dans la dérégulation du CYP2E1 chez les patients diabétiques et atteints de stéatohépatite non-alcoolique (Moncion et al., 2002; Truong et al., 2005).

Une élévation du niveau d'expression protéique du CYP2E1 est également retrouvée lors d'intoxications alcooliques chroniques et aiguës. Zhukov et al. (1999) ont montré que l'éthanol stabilisait la protéine en empêchant l'ubiquitinylation et l'adressage au

protéasome. De plus, le CYP2E1 exprimé au niveau intestinal semble favoriser l'apparition d'endotoxémie par hyperperméabilisation de l'intestin lors d'intoxication alcoolique (Forsyth et al., 2014). Celle-ci peut, au même titre qu'une infection, créer un contexte inflammatoire modulant négativement l'expression du CYP2E1 (Abdelmegeed et al., 2013; Keshavarzian et al., 2009).

b. Régulation du CYP2E1 par les xénobiotiques

L'éthanol est non seulement un substrat du CYP2E1 mais également un inducteur qui agit par stabilisation de la protéine. Ce mécanisme est partagé par d'autres molécules telles que l'imidazole ou le 4-méthylpyrazole. Ce dernier se fixe sur la protéine et permet sa stabilisation mais en inhibe l'activité. D'autres mécanismes transcriptionnels ou traductionnels ont été décrits. Par exemple, l'acétone et la pyridine peuvent accroître la traductibilité du messenger en augmentant le nombre de ribosomes fixés sur l'ARNm du CYP2E1 (Winters et al., 1992; Zhukov et al., 1999).

c. Implication dans la toxicité des xénobiotiques

La toxicité induite par le CYP2E1 a plusieurs origines. Elle provient d'une part du stress oxydatif produit par son cycle catalytique, et d'autre part, de ses substrats. En effet, les métabolites issus des réactions catalysées par le CYP2E1 sont souvent réactifs. Cependant, même en absence de substrat, le CYP est capable de produire une grande quantité d'EROs et d'induire l'apoptose (Chen et al., 1998). Le CYP2E1 fait partie des CYPs présents au niveau de la mitochondrie. Même si cet organite est la source physiologique d'une quantité importante d'EROs notamment par la phosphorylation oxydative, elle n'en est pas moins sujette à leurs effets délétères. En effet, plusieurs études ont montré que le stress oxydatif pouvait induire des modifications membranaires principalement au travers de la peroxydation lipidique et de la création de pores de transition de perméabilité membranaire induisant la libération dans le cytosol de facteurs pro-apoptotiques comme le cytochrome c (Haouzi et al., 2000; Petrosillon et al., 2001). De plus, d'autres travaux ont mis en évidence le rôle prépondérant de la fraction mitochondriale du CYP2E1 dans le stress oxydatif induit par le paracétamol et l'éthanol (Bansal et al., 2010; Knockaert et al., 2011).

d. Méthode de dosage de l'activité enzymatique du CYP2E1

De par l'importance clinique que revêt l'étude du CYP2E1, diverses molécules identifiées comme substrats spécifiques de cette enzyme et ont été utilisées comme sonde *in vitro* afin de mesurer son activité. Notamment, l'aniline, le N-diméthylnitrosamine et le p-nitrophénol, trois molécules dont l'oxydation microsomale est induite par l'alcool. (Koop et al., 1982; Moyer, 1985; Patten et al., 1986)

➤ Activité aniline hydroxylase

L'aniline est un composé organique aromatique dérivé du benzène qui était utilisé initialement dans l'industrie du colorant, notamment dans les encres. Aujourd'hui, l'utilisation de cette molécule se résume quasi exclusivement à l'industrie plastique.

La transformation de l'aniline en *p*-aminophénol, ainsi que la méthode de dosage colorimétrique, ont été décrites pour la première fois par Brodie et al. (1948). Plus tard dans les années 90, le CYP induit par l'éthanol et responsable de son oxydation a été associé à cette activité (Figure 7) (Koop et al., 1982; Ryan et al., 1985). Peu après, cette enzyme fut associée à l'activité *N*-nitrosométhylethylamine *N*-déméthylation (Patten et al., 1986).

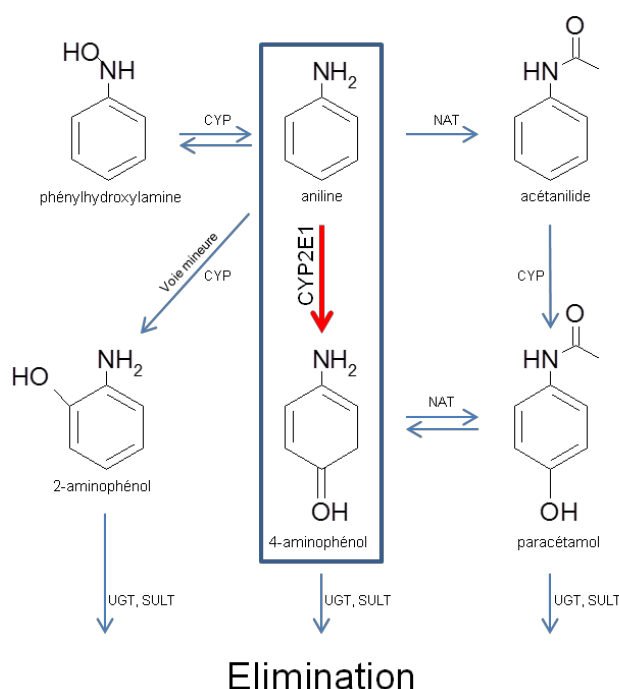


Figure 7 : Métabolisme hépatique de l'aniline. Adapté de Hartman et al., 2014.

NAT, *N*-acétyltransférase ; UGT, UDP-glucuronosyltransférase ; SULT, sulfotransférase.

Actuellement, cette méthode est utilisée pour évaluer l'activité du CYP2E1 *in vitro* sur cellules ou fractions microsomales et *in vivo* sur modèles animaux exclusivement, en raison de la toxicité de l'aniline. Notons qu'il existe un métabolisme du 4-aminophénol formé par le CYP2E1 impliquant les enzymes de phase II (figure 7) (Karakurt et al. 2013; Yue et al. 2009; Dicker et al., 1990).

➤ **Le *p*-nitrophénol**

L'hydroxylation du *p*-nitrophenol en 4-nitrocatechol a été largement utilisée pour quantifier l'activité du CYP2E1. La quantification du métabolite peut être réalisée par spectrophotométrie UV ou par détection électrochimique (Mishin et al., 1996; Tassaneeyaku et al., 1993). Cette sonde est utilisée couramment pour mesurer l'activité du CYP2E1 sur des fractions microsomales, des foies perfusés (Miyamoto et al. 2013) et des modèles cellulaires (Shen et al., 2006). Plusieurs études rapportent un métabolisme de phase II conséquent du *p*-nitrophénol et de son métabolite observé sur modèles cellulaires cutanés et sur microsomes hépatiques (El-Bachá et al., 2000; Manevski et al., 2015; Rugstad et al., 1975). Les CYP3A sont également impliqués dans la formation du 4-nitrocatechol (Zerilli et al. 1997).

➤ **La N-diméthylnitrosamine (NDMA)**

La NDMA est une molécule procarcinogène retrouvée fréquemment comme contaminant alimentaire. Le CYP2E1 est reconnu pour être l'enzyme principale impliquée dans la N-déméthylation de la NDMA chez l'Homme (Wrighton et al. 1986) et le rat (Levin et al., 1986). Cette sonde est utilisée sur microsomes et cultures cellulaires (Oesch-Bartlomowicz et al. 2005; Yamazaki et al. 1996; Kapoor et al. 2006).

Si toutes ces molécules permettent, avec plus ou moins de pertinence, de déterminer l'activité du CYP2E1 *in vitro* et *in vivo* sur modèles animaux, elles n'en restent pas moins des molécules toxiques qui ne peuvent être utilisées chez l'Homme. Aujourd'hui, seule la chlorzoxazone, un relaxant musculaire, peut être utilisée *in vitro* et *in vivo* chez l'Homme et l'animal pour mesurer l'activité du CYP2E1.

➤ La chlorzoxazone (CZX)

In vitro sur microsomes, la 6-hydroxychlorzoxazone (HCZX) est le seul métabolite identifié de la CZX, mais plusieurs études ont remis en question la sélectivité de la CZX vis-à-vis du CYP2E1. Peter et al. (1990) ont induit, sur microsomes hépatiques humains, une inhibition de l'activité enzymatique supérieure à 80% en utilisant un anticorps monoclonal de lapin dirigé contre le CYP2E1 humain. Des résultats similaires ont été obtenus par Shou et al. (2000) selon la même technique. Cependant, une autre étude a montré une inhibition de l'activité de 47% en utilisant un anticorps anti-CYP3A humain suggérant une contribution de cette famille de CYP à la 6-hydroxylation de la CZX (Gorski et al., 1997). Ono et al. (1995) ont montré que le CYP1A2 intervenait également dans cette réaction. Mais, en regard des Km respectifs du CYP1A1 et 2E1 vis-à-vis de la chlorzoxazone, ils ont souligné l'importance de travailler à des concentrations élevées en substrat afin de conserver une spécificité importante vis-à-vis du CYP2E1. Lors de la réalisation d'études *in vitro* sur microsomes, une attention particulière doit être portée au choix du solvant dans lequel est dissoute la CZX. L'utilisation du méthanol à 0,2% diminue la formation du métabolite de 60% (Chauret et al., 1998). De même, l'acétone, le diméthylsulfoxyde (DMSO) et l'isopropanol diminuent jusqu'à 70% l'activité enzymatique lorsqu'ils sont utilisés à 1 % (v/v). L'acétonitrile, semble être le seul solvant sans effet lorsqu'il est utilisé dans des proportions inférieures à 5% (v/v)(Hickman et al., 1998).

In vitro dans des modèles de cellules en culture, des biais expérimentaux similaires ont été observés quant à la sélectivité imparfaite de la CZX vis-à-vis des CYP2E1 et 1A (Carriere et al., 1993). Néanmoins, cette étude a confirmé l'implication majeure du CYP2E1 comparativement aux CYP1A, en regard de leur niveau d'expression hépatique chez l'Homme et de leurs Km respectifs pour la CZX.

Ex vivo sur foie de rat perfusé, Mehvar et al. (2006) ont démontré que la totalité de l'HCZX était conjuguée sous forme de glucuronide mais seuls 80 à 95% de la dose de CZX administrée était retrouvée sous forme d'HCZX glucuronidée. Ces résultats pourraient être dus à un métabolisme parallèle de la CZX.

In vitro sur hépatocytes humains, l'impact des solvants a été également évalué confirmant l'influence négative du méthanol à partir de 1 % et du DMSO dès 0,1 % sur l'activité du

CYP2E1 (Easterbrook et al., 2001). La 6-hydroxychlorzoxazone est souvent quantifiée directement, sans traitement préalable dans le milieu de culture après incubation, par spectrométrie UV ou spectrométrie de masse. La littérature rapporte des durées d'incubation et des concentrations en CZX très variables, allant de 45 minutes à 6 heures pour des concentrations de 15 μM à 600 μM (Gerbai-chaloin et al., 2014; Ubeaudi et al., 2001).

In vivo chez l'Homme, la CZX est l'unique molécule pouvant être utilisée comme marqueur de l'activité du CYP2E1. La 6-hydroxylation de la CZX et sa glucuronidation secondaire représentent les voies métaboliques majeures. Plusieurs études ont montré que le HCZX-glucuronide est le métabolite majeur de la CZX retrouvé dans le plasma et l'urine. C'est pour cette raison que lors du dosage de l'HCZX au sein de fluides biologiques il est nécessaire d'avoir une étape de digestion préalable par une glucuronidase (Lucas et al., 1993). Le ratio métabolique (HCZX / CZX) au sein du sérum et la quantité de métabolite excrété dans les urines sont utilisés comme index de l'activité du CYP2E1 chez l'Homme. (Dreisbach et al., 1995; Ernstgård et al., 2004; Lainé et al., 2006).

Lors du dosage de la CZX et de ses métabolites au sein de fluides biologiques, plusieurs étapes sont critiques. En plus d'un effet important de la matrice, divers paramètres peuvent influencer l'efficacité de l'hydrolyse tels que la nature et la position du carbone ou de l'hétéroatome impliqué dans la liaison à l'acide glucuronique, ou encore l'efficacité de la glucuronidase variable en fonction de son origine (Taylor et al., 2005; Elsohly et al. 2005). L'hydrolyse acide est une alternative qui devrait se limiter aux molécules les plus stables car elle peut causer leur dégradation (Alvarez-Sánchez et al., 2009). A la suite de cette hydrolyse, une étape d'extraction est souvent nécessaire avant l'étape analytique. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées comme l'extraction sur phase solide (SPE) ou l'extraction liquide-liquide (LLE). Cette dernière nécessite l'utilisation de solvants organiques (éther, acétate d'éthyle, chloroforme, etc.) insolubles en phase aqueuse. En fonction du solvant utilisé, le rendement d'extraction est variable et dépend du coefficient de partage propre à chaque molécule (Pozharitskaya et al., 2009). Ainsi, l'extraction simultanée de plusieurs molécules ayant des caractéristiques physico-chimiques différentes peut induire des pertes de métabolites dues à des rendements très variables. L'extraction sur phase solide constitue

une alternative intéressante car de nombreuses méthodes de séparation peuvent être utilisées (C18, chromatographie échangeuse d'ion, etc.). Enfin, la précipitation des protéines peut être réalisée préalablement à la LLE et SPE et limite la perte de métabolites due à une fixation protéique. Le dosage peut être également réalisé directement après précipitation des protéines, cependant sur des fluides complexes comme le sérum, cette méthode lors d'une analyse UV conduit fréquemment à l'obtention d'un bruit élevé et à la présence de composés co-éluants avec la molécule d'intérêt.

1.1.8. Le CYP2B6

Localisé sur le chromosome 19, le gène *CYP2B6* code une protéine de 48 kDa (Santisteban et al., 1988). Le CYP2B6 représente moins de 5% du pool hépatique total en CYPs, mais présente une très forte variabilité d'expression protéique interindividuelle pouvant aller jusqu'à un facteur 100 en raison notamment du polymorphisme génétique important et de la régulation par les RNs (Lang et al. 2001; Hofmann et al. 2008). L'activation transcriptionnelle est permise par la présence, au sein des régions promotrices d'éléments de réponse aux facteurs de transcription comme PBREM en -1,7 kb et XREM en -8,5 kb sur lesquels peuvent se fixer CAR et PXR (Faucette et al., 2004; Sueyoshi et al., 1999).

Principalement exprimé au niveau hépatique, ce CYP est retrouvé dans une moindre mesure dans l'intestin, la muqueuse nasale, les reins, la peau, le cœur, les lymphocytes périphériques et les macrophages bronchoalvéolaires (Ding et al., 2003; Gervot et al., 1999; Janmohamed et al., 2001). Il a également été retrouvé exprimé dans le cerveau et semble induit chez les individus fumeurs et/ou alcooliques (Miksys et al., 2003). Ce CYP intervient dans le métabolisme endogène des hormones stéroïdiennes (17 β -œtradiol, estrone, éthinylestradiol, testostérone) et de certains acides gras comme l'acide laurique (Ekins et al. 1998). Il est également responsable du métabolisme d'un très grand nombre de médicaments tels que des antiarhythmiques (propafenone, mexiletine), des antidépresseurs (amtriptyline, paroxetine), des β -bloquants et anti-cancéreux (cyclophosphamide, tamoxifène). Il intervient également dans le métabolisme des pesticides (chloropyrifos, méthoxychlor, α -endosulfan) et du DEET (*N,N*-diéthyl-3-méthylbenzamide) utilisé dans les lotions répulsives (Casabar et al., 2006; Tang et al., 2001), ainsi que dans le métabolisme des

hydrocarbures linéaires et aromatiques polycycliques (Edwards et al., 2005; Shou et al., 1994).

a. Polymorphisme et régulation physiopathologique

Comme cela est le cas pour la plupart des CYPs, les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF- α sont responsables d'une inhibition transcriptionnelle (Abdel-Razzak et al. 1993). Cette modulation est perceptible au niveau enzymatique lors de la mesure de l'activité par l'hydroxylation du bupropion (Aitken et al., 2007; Rubin et al., 2015). Peu d'études se sont intéressées au statut du CYP2B6 en contexte physiopathologique. Cependant, le mécanisme d'induction indirecte initié par le phénobarbital a ouvert une voie. En effet, cette induction dépend de la phosphorylation de la thréonine 38 du récepteur CAR qui est réalisée par l'AMPK (AMP-activated protein Kinase) après activation par l'AMPc. Ce dernier est augmenté lors d'une exposition au phénobarbital (Rencurel et al. 2006). L'AMPK joue un rôle de senseur énergétique et peut être affectée par le statut métabolique de la cellule. Plusieurs études ont démontré une modification de l'inductibilité des orthologues du *CYP2B6* chez le rat et la souris (*CYP2B1* et *Cyp2b10*). Sur des hépatocytes de rat rendus diabétiques grâce à la streptozotocine, l'insuline inhibe l'induction par le phénobarbital du *CYP2B1* (Yoshida et al., 1996). A l'inverse, les corps cétoniques induisent les CYP2B dans des hépatocytes de rat non traités à la streptozotocine (Zangar et al., 1997). Truong et al. (2005) ont démontré sur des cellules Fao que l'insuline diminuait la stabilité de l'ARNm du CYP2B1. Ainsi, il est probable que ce CYP soit modulé différemment chez l'Homme en contexte physiopathologique comme le jeûne ou le diabète.

La grande variabilité individuelle associée à l'expression de ce gène s'explique également par son polymorphisme. En effet, plus de 37 variants alléliques codant pour des changements d'acides aminés ont été identifiés, parmi eux, au moins 16 variants ont un effet sur l'activité enzymatique (www.cypalleles.ki.se). Le *CYP2B6**6 (Q172H et K262R) se retrouve chez 20 à 31% des individus caucasiens, jusqu'à 60 % dans les populations africaines et est associé à une diminution de l'expression protéique du CYP (Desta et al., 2007; Lamba et al., 2003; Lang et al., 2001). Le variant *4 (K262R) est retrouvé avec une fréquence de 2 à 6 % et est associé à une modification de la sélectivité de l'enzyme. Son activité d'hydroxylation est augmentée envers le bupropion, la nicotine, l'efavirenz, mais l'enzyme devient incapable de métaboliser le 17- α éthinylestradiol (Kirchheiner et al. 2003; Johnstone et al. 2006; Rotger et al. 2007).

Dans les populations africaines, le *CYP2B6*18* (I328T) survient avec une fréquence allant jusqu'à 12 %. Il est responsable de la production d'une protéine non-fonctionnelle suite à un défaut d'épissage (Klein et al. 2005; J. Li et al. 2012; Mehlotra et al., 2007). Récemment, au sein d'une population rwandaise, 8 nouveaux SNPs non-synonymes du *CYP2B6* ont été identifiés (allèles *33 à *37). L'étude a démontré à l'aide d'un système recombinant qu'au moins quatre de ces SNPs étaient associés à une perte de fonction (Radloff et al. 2013). Le *CYP2B6* est l'enzyme principale impliquée dans le métabolisme de l'efavirenz, un antirétroviral actuellement utilisé dans le traitement du VIH. Ainsi, l'intérêt clinique du polymorphisme du *CYP2B6* est majeur au sein des populations où l'incidence du VIH est élevée. Cela est particulièrement vrai pour les populations africaines qui présentent une grande diversité génétique mais qui restent peu caractérisées au niveau de leur polymorphisme (Tishkoff et al., 2009).

b. Régulation par les xénobiotiques

L'expression du hCYP2B6 est contrôlée par hCAR et hPXR. Ces deux RNs présentent une grande variabilité de ligands en comparaison de leurs homologues chez la souris et le rat. Par exemple, le TCPOBOP est un activateur de mCAR mais pas de hCAR. Il est donc délicat d'extrapoler à l'Homme les résultats obtenus sur des modèles animaux.

Si hCAR est principalement responsable de l'activation transcriptionnelle du *CYP2B6* réalisée par l'inducteur prototypique qu'est le phénobarbital, hPXR joue également un rôle important dans la régulation du *CYP2B6*. En effet, de nombreux inducteurs du *CYP3A4*, ligands de hPXR sont également des inducteurs du *CYP2B6* tels que la rifampicine, la troglitazone et l'hyperforine. La perméabilité du LBD de hPXR est en grande partie responsable de ce chevauchement de substrat entre hCAR et hPXR.

c. Implication dans la toxicité des xénobiotiques

Le *CYP2B6* est responsable de la formation de métabolites réactifs de type oxon (P=O) dérivés des pesticides organophosphorés (Crane et al., 2012). Il est également responsable de la déméthylation de la MDMA (N-méthyl-3,4-méthylènedioxyméthamphétamine ou « ecstasy ») en un métabolite potentiellement neurotoxique (Kreth et al., 2000). Il intervient dans le métabolisme d'agents alkylants utilisés en thérapie anti-cancer, comme l'ifosfamide qu'il transforme en un métabolite néphrotoxique (Aleksa et al., 2005), et le

cyclophosphamide qu'il transforme en acroléine et en dérivé phosphoramidate (Huang et al., 2000).

1.1.9. Le CYP3A4

Situé sur le chromosome 7, le gène du CYP3A4 est fortement exprimé dans le foie où il produit jusqu'à 30 % du pool hépatique en CYPs. Il intervient dans le métabolisme des médicaments de plus de 38 classes thérapeutiques tels que le paracétamol, le tamoxifène et les statines. Il participe aussi au métabolisme de composés endogènes comme l'œstradiol, le cortisol et la testostérone.

L'expression constitutive du CYP3A4 peut être régulée par divers facteurs de transcription incluant C/EBP α , C/EBP β , HNF1 α , HNF3 γ , HNF4 α (Martínez-Jiménez et al., 2005; Rodríguez-Antona et al., 2003; Tirona et al., 2003). Au niveau hépatique, HNF4 α conditionne également l'amplitude de l'induction induite par CAR et PXR en réponse aux xénobiotiques (Tirona et al., 2003). La régulation par les molécules exogènes est permise par la présence de plusieurs éléments de régulation cis au sein du promoteur du CYP3A4, comme l'élément de réponse proximal à PXR situé entre -149 et -172 paires de bases et l'élément activateur distal de réponse à PXR situé entre -7,2 et -7,8 kb du codon d'initiation de la transcription (Ramiro et al., 2009; Goodwin et al., 1999).

a. Polymorphisme génétique et régulation physiopathologique du CYP3A4

Dans le cas du CYP3A4, la variabilité interindividuelle ne peut être expliquée par le seul polymorphisme du gène car à ce jour, aucun lien génotype-phénotype n'est encore clairement établi. Il semblerait que les variations d'activité du CYP3A4 chez l'Homme soient avant tout dues à un polymorphisme de régulation (Schuetz 2004). Les corrélations observées dans l'expression des gènes de la sous-famille CYP3A et l'expression de CAR et PXR viennent confirmer cette hypothèse (Pascussi et al. 2001; Lin et al. 2002). Mais récemment, le CYP3A4*22 a été associé à une diminution de l'expression transcriptionnelle dans des cellules en culture et à une diminution de l'expression protéique au sein de foies humains. Chez l'Homme, Wang et al., (2011) ont montré que pour les porteurs de ce variant, la dose thérapeutique de statines devait être réduite de 40 à 80 %. Même si selon ces travaux, la présence de ce polymorphisme pourrait être utilisée comme biomarqueur pour

prédire le profil du métabolisme du CYP3A4, ce SNP n'explique que 7 % de la variabilité transcriptionnelle observée au sein de leur étude (D. Wang et al. 2011).

Les travaux de Thomas et al. (2013) sur des hépatocytes humains ont démontré qu'une phosphatidylcholine endogène, la POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycérol-3-phosphocholine), pouvait induire l'expression du CYP3A4 par l'intermédiaire de PPAR α (Thomas et al. 2013; Chakravarthy et al. 2009). Le contenu cellulaire en POPC est contrôlé par FAS et CEPT-1 et est augmenté lors de certaines perturbations métaboliques (obésité, stéatose hépatique). Ainsi, selon l'auteur, ce mécanisme pourrait expliquer les variations d'expression des EMXs lors de ces atteintes métaboliques. Cependant, pour le CYP3A4, ces résultats divergent avec les observations réalisées chez l'Homme, puisque la stéatose et la NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease) sont associées à une diminution l'expression du CYP3A4. Des études menées au sein de notre laboratoire montrant que certains acides gras sont capables de diminuer l'activité du CYP3A4 pourraient expliquer cette divergence (Thomas et al. 2013; Fromenty, 2013).

b. Régulation par les xénobiotiques

Parmi les contaminants environnementaux, l'endosulfan est un pesticide organochloré. Celui-ci est vendu en mélange stéréoisomérique contenant 70 % de la forme α et 30 % de la forme β . Plusieurs travaux ont montré que l' α -endosulfan était un agoniste du récepteur PXR et qu'il était capable d'induire le CYP3A4 et le CYP2B6 au sein d'hépatocytes humains et de lignées stables dérivées d'HepG2 (Casabar et al. 2010; Casabar et al. 2006; Coumoul et al., 2002). D'une manière générale, la régulation du CYP3A4 par les xénobiotiques est contrôlée en grande partie par les RNs CAR et PXR. Ainsi, de nombreuses molécules peuvent induire l'expression du CYP3A4 comme le métamizole, les statines ou encore certaines aflatoxines (Kocarek et al. 2002; Saussele et al. 2007; Ratajewski et al. 2011).

c. Implication dans la toxicité des xénobiotiques

Les mycotoxines constituent un danger pour la santé humaine et animale. En effet, si peu d'entre elles sont associées à une modulation des EMXs, certaines comme l'aflatoxine B1 (AFB1) sont des hépatocarcinogènes puissants. L'AFB1 est produite par divers champignons tels qu'*Aspergillus flavus* et *parasiticus*, ces espèces de champignons infectent fréquemment les céréales et arachides lorsqu'ils sont conservés dans de mauvaises conditions. Cette

toxine pose un problème de santé publique, en particulier dans les régions climatiques offrant des conditions favorables au développement du champignon telles que l'Afrique subsaharienne, l'Asie et l'Amérique du sud. L'AFB1 associée à la prévalence élevée des virus de l'hépatite (A, B, C) au sein de ces régions constitue un facteur de risque majeur dans le développement du carcinome hépatocellulaire (Groopman et al. 2008; Eaton et al., 1994; Wild et al., 2009).

L'AFB1 est un procarcinogène métabolisé par les CYPs, en particulier les CYP1A1, CYP3A4 et 3A5 (Yamazaki et al., 1995). Plusieurs métabolites sont ainsi produits tels que l'époxyde (AFBO), l'aflatoxine M₁, Q₁ et P₁, mais seule l'AFBO et dans une moindre mesure l'AFBM₁ sont des métabolites réactifs (Hsieh et al., 1985). L'AFBO (exo-AFB-8,9-epoxide) est un intermédiaire capable de créer des liaisons covalentes avec les macromolécules cellulaires et en particulier avec l'ADN. L'adduit principal est l'AFB-N₇-guanine, instable, celui-ci est rapidement éliminé par dépurination (Bennett et al., 1981). Mais dans certaines conditions, cet adduit peut être stabilisé par un réarrangement moléculaire et engendrer des altérations somatiques (Bedard et al., 2006).

1.1.10. Le CYP1A1

Le gène du CYP1A1 est constitué de 6 introns et 7 exons. Localisé sur le chromosome 15 avec le *CYP1A2*, il partage avec celui-ci un promoteur bidirectionnel contenant au moins 13 éléments de réponse AhR. Certains de ces éléments de réponse semblent être capables d'induire les deux gènes simultanément (Jorge-Nebert et al., 2010; Ueda et al., 2006). Chez l'Homme, le CYP1A1 est faiblement représenté dans le foie en comparaison du CYP1A2 et on le retrouve particulièrement exprimé au niveau des poumons, des reins et dans une moindre mesure au niveau de l'intestin (Ding et al., 2003). Le CYP1A1 intervient dans le métabolisme de substrats endogènes comme les hormones (17 β -œstradiol et mélatonine) et certains médiateurs pro-inflammatoires (acide arachidonique et eïcosapentoïque) (Arnold et al., 2003; Ma et al., 2005; Schwarz et al., 2004). Le CYP1A2 intervient dans le métabolisme de nombreux médicaments comme les antipyrétiques (phénacétine, lidocaïne), les antipsychotiques (clozapine, olanzapine) ou encore certains anti-inflammatoires (Gunes et al., 2008). A l'inverse, le CYP1A1 intervient essentiellement dans la biotransformation de contaminants environnementaux tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques

(Androutsopoulos et al., 2009). Par exemple, le dibenzo[a]pyrène, qui est considéré comme l'un des plus puissants procarcinogènes au sein des HAP, est oxydé quasi exclusivement par le CYP1A1 pour former un diol-époxyde (Shou et al., 1996).

a. Polymorphismes et régulation physiopathologique.

Plus de 10 variants alléliques ont été décrits au sein de différentes populations. Mais ils sont, pour la plupart, rares et leur impact fonctionnel est inconnu (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp1a1.html>). Le rôle limité du CYP1A1 dans le métabolisme des médicaments explique pourquoi son polymorphisme ne semble avoir que peu d'impact au niveau thérapeutique. En revanche, son implication dans le métabolisme de substrats endogènes est importante. En effet, Le CYP1A1 est considéré comme l'enzyme majoritairement responsable de l'hydroxylation du 17 β -œstradiol dans les tissus extra-hépatiques comme le sein (Lee et al., 2003). Cette réaction conduit à la formation de catéchols (œstrogène 2-hydroxy E2 (2-OH-E2) et œstrogène 4-hydroxy E2 (4-OH-E2)) qui sont ensuite métabolisés par la catéchol-O-méthyltransferase (COMT) avant d'être pris en charge par les enzymes de phase II (Bao et al., 2002). En conditions pathologiques, lorsque la conjugaison par les enzymes de phase II n'est plus suffisante, les catéchols peuvent être oxydés et former des dérivés de quinones. Si le produit de la COMT, le 2-méthoxyœstradiol, (2-MeO-E2) présente des propriétés antitumorogéniques et antiangiogéniques et semble prévenir le risque de cancer associé aux œstrogènes notamment dans les organes cibles comme le sein, son oxydation subséquente semble être associée à un risque carcinogénique (Cavalieri et al., 2000; Zhu et al., 1998). En effet, les quinones formées lors de l'oxydation du 2-MeO-E2 sont des métabolites réactifs capables de former des adduits à l'ADN. Le 4-OH-E2 constitue un métabolite mineur du CYP1A1 mais est responsable de la formation d'adduits conduisant à une dépurination et pouvant initier la tumorigenèse.

Les allèles les mieux définis sont le *CYP1*4* (T451N) et le *CYP1A1*2* (I462V). D'un point de vue fonctionnel et vis-à-vis de substrats comme le B[a]P ou l'éthoxyrésorufine ces variants ne semblent pas impactés par le changement d'acides aminés (Persson et al., 1997; Schwarz et al., 2001; Zhang et al., 1996). En revanche, pour le *CYP1*2*, Kisselev et al. (2005) ont démontré *in vitro*, une augmentation de l'activité enzymatique vis-à-vis du 17 β -œstradiol.

Chez l'Homme, l'association de ce polymorphisme avec les cancers œstrogéno-dépendants n'est pas clairement élucidée et les résultats des études cliniques divergent. Par exemple, le

risque d'avoir un cancer du sein est plus élevé chez les femmes caucasiennes portant l'allèle *CYP1A1*2* (Ambrosone et al. 1995). Par opposition, ce variant semble associé à un risque réduit de développer une tumeur mammaire chez les femmes d'origine asiatique (Huang et al., 1999; Miyoshi et al., 2002). L'implication de la COMT et des enzymes de phase II qui sont des enzymes polymorphiques dans le métabolisme des œstrogènes a un impact sur le risque de cancer et explique en partie cette divergence (Mitrunen et al., 2003). Il est vraisemblable que le risque de cancer élevé associé au variant *CYP1A1* retrouvé dans certaines études dépende également de l'expression du variant COMT-L associé à une faible activité et à un défaut dans l'expression des GSTs (Kisselev et al., 2005).

b. Régulation par les xénobiotiques

Le *CYP1A1* est principalement contrôlé par AhR qui est présent dans le cytoplasme sous forme de complexe avec deux Hsp90 et la protéine p23. En présence d'un ligand exogène comme le B[a]P ou la 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD), le complexe formé par AhR est transloqué dans le noyau ou il s'hétérodimérise avec l'ARNT. Cet hétérodimère se fixe sur les séquences de régulation (AhRE, DRE) situées dans la région promotrice du *CYP1A1* pour initier la transcription (Puga et al., 2009).

Les ligands d'AhR comme la TCDD sont responsables d'effets toxiques très diverses tels que l'acné chlorique, une toxicité immune et reproductive ou encore la carcinogénèse. L'activation du récepteur AhR seul, ne suffit pas à expliquer cette diversité. En effet, la TCDD peut activer d'autres voies de signalisation, notamment celle des MAPKs. Divers travaux, ont montré que les MAPKs potentialisent l'activation transcriptionnelle induite par le complexe AhR-ARNT grâce à la phosphorylation de l'ARNT et d'un résidu tyrosine sur AhR. De plus, ces kinases peuvent modifier d'autres partenaires répresseurs ou activateurs et moduler l'effet inducteur induit par AhR (Carlson et al., 2002; Minsavage et al., 2003; Tan et al., 2004).

c. Implication dans la toxicité des xénobiotiques

Le B[a]P est l'un des HAP les plus abondants. Celui-ci est présent dans les fumées d'échappements, de cigarettes et dans les aliments carbonisés. Parmi ses principaux métabolites, le (-)-benzo[a]pyrène-trans-7,8-dihydrodiol (BPD) et le (+)-anti-benzo[a]pyrène-trans-7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde (anti-BPDE) sont les plus impliqués dans la carcinogénèse (Tarantini et al., 2011). Ce dernier est impliqué dans la formation d'adduits au niveau des

guanines responsable de transition G → T. Il semblerait que cet adduit soit associé à la fréquence élevée de mutations G → T retrouvées au sein de *p53* dans le cancer pulmonaire chez les fumeurs (Hainaut et al., 2001). Le CYP1A1 est également impliqué dans la formation de métabolites carcinogènes à partir d'autres HAP comme le 7,12 diméthyl-benzanthracène (DMBA) ou d'amines hétérocycliques comme le 2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo [4,5-b]pyridine (PhIP) (Androutsopoulos et al., 2009).

1.2. Les enzymes de phase II

Les enzymes de phase II catalysent des réactions de conjugaison qui aboutissent à la formation de métabolites hydrosolubles et facilement éliminables. Une grande variété de groupements peuvent être greffés, comme le méthyle, l'ion sulfate et l'acétyle ainsi que des molécules plus complexes d'origine protéique ou glucidique. Dans ce chapitre, nous ne décrivons que les UDP-glucuronosyltransférases impliquées dans la glucuro-conjugaison et les glutathions transférases impliquées dans le transfert du glutathion.

1.2.1. Les uridine 5'-phosphoglucuronosyltransférases

a. Généralités

Actuellement, 19 uridine 5'-phosphoglucuronosyltransférases (UGTs) fonctionnelles impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques ont été identifiées chez l'Homme (Mackenzie et al. 2005; Bock 2010). Elles sont classées en trois sous-familles : UGT1A, UGT2A et UGT2B. Le locus *UGT1A* est localisé sur le chromosome 2q37 et comprend plusieurs variants de l'exon 1. En effet, les UGTs de cette sous-famille partagent les exons 2 à 6, seul l'exon 1 est variable. Le locus *UGT2* est situé sur le chromosome 4q13 et inclut trois UGT2A et sept UGT2B. Ces enzymes sont polymorphes, plus de 200 allèles ont été décrits pour les gènes *UGT1* et *UGT2* influençant aussi bien l'activité enzymatique que l'expression génique (http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/cms/ugt_alleles)

Les UGTs 1A1, 1A3 1A4, 1A6, 1A9, 2B4, 2B10, 2B7 sont principalement exprimées dans le foie et dans une moindre mesure au niveau des reins, des poumons, des ovaires des testicules, des glandes mammaires et de la prostate. Ces enzymes sont également représentées au niveau du tractus gastro-intestinal mais les UGTs 1A7,1A8 et 1A10 qui ne sont pas exprimées au niveau hépatique, sont prédominantes (Strassburg et al., 2000).

Ce sont des enzymes microsomiales dont le site catalytique est exposé à la lumière de RE par opposition au CYPs. Elles catalysent la glucuronidation qui est une réaction de substitution nucléophile entre un groupement glycosyle couplé à l'uridine diphosphate et un groupement polaire fonctionnel d'un xénobiotique ou d'un endobiotique. Généralement, les groupements concernés sont les phénols, les amines primaires, secondaires et tertiaires, ou encore les acides carboxyliques. Cependant, il existe de nombreux exemples de glucuronidation réalisée sur des groupements ou atomes non-nucléophiles tels que le carbone, le soufre, le sélénium ou encore les groupements carbamoyl (Argikar, 2012). De même, si dans le cas des UGT1 et 2 le groupement donneur de glycosyl est souvent l'acide UDP-glucuronique, d'autres sucres peuvent intervenir tels que le glucose, le galactose ou le xylose (Senafi et al., 1994; Mackenzie et al., 2005; Mackenzie et al., 2008).

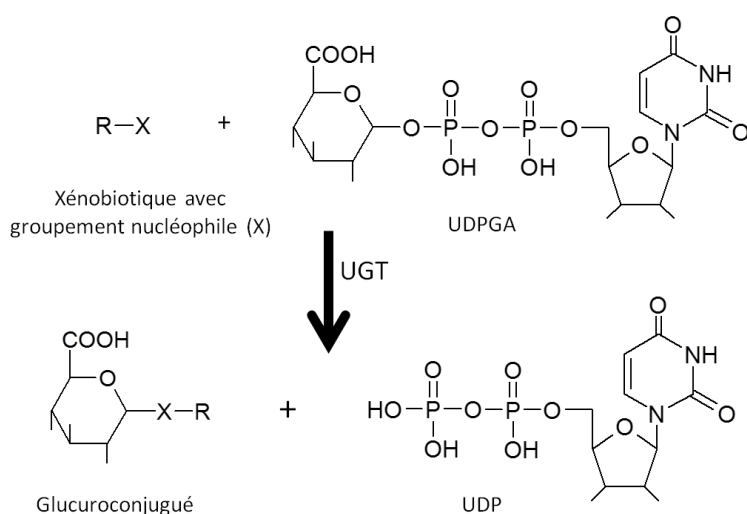


Figure 8 : Mécanisme de glucuronidation par les UGTs.

Cette réaction se produit entre le groupement polaire fonctionnel du substrat et le co-substrat UDPGA (acide uridine diphosphoglucuronique). Elle libère de l'uridine diphosphate (UDP) et le glucuroconjugué.

b. Spécificité de substrats des UGTs

Ces enzymes sont responsables de l'inactivation de nombreux composés endogènes et exogènes. Comme l'illustre le tableau 1, les UGT1A et 2B partagent un grand nombre de substrats tels que les hormones stéroïdiennes, la bilirubine et les acides biliaries. Les UGT1A métabolisent préférentiellement les composés aminés, les molécules phénoliques complexes, les dérivés imidazolés ainsi que le B[a]P et ses dérivés (Bock, 2010).

Tableau 1: Substrats des UGTs et facteurs de transcriptions impliqués dans leur régulation

(modifié de Bock, 2010 et Bigo et al. 2013). * substrat exclusif.

Isoforme	Substrats		Effets notables	Récepteurs nucléaires	Références
	endogènes	Exogènes			
UGT1A1	Bilirubine* œstradiol Eicosanoïdes	Paracétamol, Irinotecan, Phénobarbital	Maladie de Crigler-Najjar et syndrome de Gilbert (hyperbilirubinémie liée à un SNP conduisant codant une protéine non-fonctionnelle)	AhR↑ CAR↑ PXR↑ GR ↑ HNF1α↑ HNF4α↑ Nrf2↑ PPARα↑	Olinga et al., 2008; Sugatani et al., 2005; Westerink et al., 2010 Kadacol et al., 2000 Sugatani et al., 2001 Senekeo et al., 2007 Aueviriyavit et al., 2007
UGT1A3	œstrogènes acides biliaires	Cyproheptadine, opioïdes, métabolites du B[a]P	responsable avec le CYP1A4 de l'inactivation de l'antiœstrogène (Faslodex)	AhR↑ FXR↑ PXR↑ HNF1α↑ LXRα↑ PPARα↑	Erichsen et al., 2010 Verreault et al., 2006 Chouinard et al., 2006 Senekeo et al., 2007 Aueviriyavit et al., 2007
UGT1A4	œstrogènes Eicosanoïdes	Antidépresseurs, (imipramine, amitriptyline, etc.), nicotine	Induit par le Faslodex (cancer du sein)	CAR↑ ERα↑ PPARα↑ PXR ↑	Edavana et al., 2013 Senekeo et al., 2007 Aueviriyavit et al., 2007
UGT1A6	sérotonine*	Paracétamol, Irinotecan, 4-nitrophénol, métabolites du B[a]P	Augmentation de l'expression protéique et de l'activité par l'éthanol	AhR↑ HNF4α↑ Nrf2↑ PPARα↑ PXR↑	Nishimura et al., 2005 Senekeo et al., 2007 Aueviriyavit et al., 2007 Bock et al., 2005
UGT1A9	œstrogènes	Paracétamol, acide mycophénolique propofol* métabolites du B[a]P	Génotype de l'UGT1A9 et 1A7 prédictif de la réponse à l'irinotecan.	AhR↑ CAR↑ HNF1α↑ HNF4α↑ PPARα↑ PXR ↑	Aueviriyavit et al., 2007 Gregory et al., 2004 Carlini et al., 2005
UGT2B4	acides biliaires androgènes	codéine fibrate	Rôle essentiel dans la détoxification des acides biliaires	FXR↑ PPARα↑	Barbier et al., 2003a Barbier et al., 2003b
UGT2B7	acides biliaires 3, 4-catéchol- œstrogènes	morphine, AINS, opioïdes, acide valproïque, zidovudine*	formation du principal métabolite actif de la morphine	RARα↓ HNF1α↑ FXR↓	Stone et al., 2003 Gregory et al., 2006 Lu et al., 2008)
UGT2B10	Acides gras polyinsaturés Eicosanoïdes	Nicotine	rôle possible dans l'addiction à la nicotine		Berg et al., 2010

c. Régulation des UGTs

Par analogie aux CYPs, la régulation adaptative des UGTs est sous le contrôle des RNs. Par exemple le récepteur AhR, dont les HAP sont des ligands activateurs affins, est capable d'induire toutes les UGTs de la sous-famille 1A. Ce récepteur est également activé par des ligands endogènes tels que la bilirubine qui est glucuronidée principalement par l'UGT1A1. Cet endobiotique est responsable du syndrome de Crigler-Najjar et de la maladie de Gilbert. Cette dernière est une maladie héréditaire causée par un polymorphisme au niveau de la région régulatrice de l'*UGT1A1*. Elle se traduit par une élévation de la bilirubinémie, asymptomatique chez l'adulte mais responsable de lésions nerveuses chez le nourrisson. D'autres mutations au niveau de l'*UGT1A1* peuvent induire une hyperbilirurémie plus sévère et causer le syndrome de Crigler-Najjar de type I ou II. Si le type I est caractérisé par une absence totale d'activité de l'UGT1A1, le type II moins agressif peut faire l'objet d'un traitement. En effet, chez les patients atteints, le phénobarbital permet d'augmenter l'expression de l'UGT1A1 et de diminuer la bilirubinémie. Comme l'illustre cet exemple, l'UGT1A1 est régulée par divers récepteurs nucléaires dont CAR et PXR. D'une manière générale, ce schéma se reproduit avec de nombreux RNs (cf. tableau1).

1.2.2. Les Glutathion-S-Transférases (GSTs)

a. Généralités

Les GSTs constituent une superfamille multigénique d'enzymes ubiquistes et multifonctionnelles jouant un rôle dans la détoxification des carcinogènes environnementaux et dans la protection vis à vis des EROs. Chez l'Homme, les GSTs sont divisées en 3 classes : les GSTs cytosoliques d'une part mitochondriales et peroxysomales d'autre part (classe κ) et enfin les GSTs microsomales appelées MAPEG (Membrane Associated Proteins involved in Eicosanoid and Glutathione metabolism). La famille des GSTs cytosoliques est divisée en 7 classes : alpha (locus : 6p12), Mu (1p13), Pi (11q13), Thêta (22q11), Omega (10q24), Sigma (4q22) et Zêta (4q24) (Hayes et al., 2005). Dans leur forme active, Les GSTs cytosoliques sont des homo- ou hétérodimères d'une taille allant de 23 à 30 kDa alors que les MAPEG sont trimériques. Cette polymérisation permet de former une grande variété d'UGTs avec un nombre restreint de gènes.

b. Spécificité de substrats

Les GSTs catalysent l'addition d'un tripeptide, le glutathion ou γ -glutamylcystéinyglycine (GSH : Glutamine-Cystéine-Glycine), au groupement électrophile de nombreux substrats. Cette réaction initie la formation d'acides mercapturiques qui sont des composés polaires et hydrosolubles facilement éliminables par les enzymes de phase III.

Le glutathion est un tripeptide ubiquitaire existant sous forme oxydée (GSSG) ou réduite (GSH) et principalement stocké sous forme libre dans le cytosol (90 %). La liaison atypique de la cystéine sur le groupement γ -hydroxyle du glutamate confère à cette molécule une résistance relative aux peptidases endogènes et lui permet d'avoir une demi-vie intracellulaire de plusieurs heures. Le GSH est le co-substrat des GSTs et des glutathion peroxydases, ces dernières réalisent la première étape de détoxification du peroxyde d'hydrogène (Lawrence et al., 1976).

De nombreux xénobiotiques sont pris en charge par les GSTs. Parmi eux, certains peuvent être spécifiques d'une isoforme donnée comme c'est le cas pour l'acide éthacrynique spécifique de l'isoforme GSTP1. A l'inverse, certains composés comme le CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzène) peuvent être métabolisés par toutes les GSTs sans distinction.

Parmi les substrats endogènes, les protéines elles-mêmes peuvent être conjuguées au glutathion par une réaction dite de S-glutathionylation. Cette modification post-traductionnelle peut entraîner l'activation ou l'inhibition de la protéine cible comme c'est le cas pour la caspase-3, limitant ainsi le processus d'apoptose (Huang et al., 2008).

c. Régulation des GSTs cytosoliques

Au même titre que les autres EMXs, la réponse adaptative des GSTs aux xénobiotiques est sous le contrôle des RNs (Maglich et al., 2002; Morel et al., 1993). Chez le rat, l'expression de ces enzymes est induite par divers inducteurs prototypiques tels que le phénobarbital, le TCPOBOP (1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzène) ou la rifampicine (Maglich et al., 2002). Ces résultats suggérant l'implication de CAR et PXR dans la régulation des GSTs, ont été confirmés par l'utilisation d'animaux invalidés pour les gènes de CAR et PXR et pour lesquels l'induction transcriptionnelle des GSTs est abolie. Des résultats semblables ont été obtenus avec le récepteur AhR sur des animaux invalidés pour ce gène.

Le récepteur AhR régule également l'expression des GSTs comme cela a été démontré dans le modèle murin DBA/2. Cette souche exprime un récepteur AhR inactif et n'est pas sujette à l'induction produite par les HAP (Chang et al., 1993).

Le facteur Nrf-2 [(NF-E2) related factor 2] jouant un rôle dans la réponse anti-oxydante, est également impliqué dans la régulation des GSTs. Présent dans le cytosol sous forme de complexe avec la protéine Keap-1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), ce facteur est libéré lors d'un stress oxydatif (McMahon et al. 2003). Cela lui permet de s'accumuler dans le noyau et de se fixer sur les séquences ARE (Anti-oxydant Response Element) en amont des gènes cibles. La liaison entre Keap-1 et Nrf-2 est permise par la présence de résidus cystéines. En effet, les groupements thiols de ces dernières sont sensibles au statut redox de la cellule et peuvent réagir lors d'un stress oxydatif ou en présence d'une molécule électrophile et permettre la dissociation du complexe Keap-1 / Nrf-2 (Dinkova-Kostova et al., 2002).

d. Régulation de la signalisation apoptotique et proliférative par les GSTs

Le rôle des GSTs dans la protection vis-à-vis de l'apoptose s'exerce au travers de leur pouvoir de conjugaison des métabolites de phase I mais également via leur interaction avec des ligands protéiques. Les GSTs M1 et P1 modulent l'apoptose en inhibant les protéines kinases ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase1) et JNK (c-Jun N-terminal Kinase) (Pajaud et al., 2012). La mort des hépatocytes primaires en culture survient par apoptose dépendante des caspases (Gilot et al., 2002).

L'addition au milieu nutritif de facteurs solubles tels que l'insuline, les glucocorticoïdes, les facteurs de croissance ou encore le DMSO favorise la survie. Dans les hépatocytes cultivés en présence de DMSO, la maturation de la caspase 3 est inhibée bloquant la phase d'exécution de l'apoptose (Gilot et al., 2002). *In vivo*, l'administration de thioacétamide induit une importante apoptose centrolobulaire impliquant les caspases 9 et 3. Le traitement simultané par le DMSO protège totalement contre les lésions tissulaires, inhibe l'activité de la caspase 9 et prévient l'activation de la caspase 3. Dans les deux modèles, *in vivo* et *in vitro*, l'apoptose est associée à une forte activité de la protéine ASK1, une induction des voies p38MAPK et/ou JNK et une diminution de l'expression de certaines isoformes de GSTs telles que M1 et A1/2. En revanche, en présence de DMSO, la protéine kinase ASK1 est inactive et l'expression de GSTs est maintenue. Notre laboratoire a démontré que la co-expression des

protéines ASK1 et GSTM1, P1 ou A1, inhibait significativement l'apoptose en comparaison de l'apoptose induite par la transfection de ASK1 « seule » dans les cultures traitées par le DMSO. Ces résultats suggéraient que la protection induite par le DMSO mettait en jeu une inhibition par les GSTs de la voie de signalisation pro-apoptotique impliquant ASK1 (Gilot et al., 2002).

Notre laboratoire a également montré l'induction de plusieurs isoformes de GSTs (A1, A4, Pi et Mu) au cours de la régénération hépatique chez la souris selon un profil biphasique à la transition G0/G1 et aux phases de réplication et de mitose (Desmots et al. 2002; Desmots et al. 2002; Pajaud et al. 2015). Le rôle des GSTs dans la signalisation mitogénique a été également abordé en utilisant des souris invalidées pour les gènes GST P1 et P2. Bien que les souris KO *GSTP1/P2*^{-/-} soient viables, il a été montré une activité élevée de la protéine kinase JNK dans le foie (Elsby et al., 2003). Pajaud et al. (2015) ont démontré que la phase initiale de régénération était profondément affectée par l'absence des gènes GST P1 et P2 avec des retards dans l'entrée et la progression en phase G1, des expressions et activations réduites et/ou décalées des acteurs des voies de signalisations STAT3, MER/ERK et JKN et des complexes CDKs/cyclines et une forte réduction de la prolifération hépatocytaire démontrant pour la première fois que les *GSTP1* et *P2* régulent le cycle cellulaire des hépatocytes (Pajaud et al., 2015).

1.3. Les modèles hépatiques *in vitro*

Comme nous l'avons évoqué, le foie est un organe majeur pour la détoxification des composés toxiques présents dans l'organisme et l'activation métabolique dont il est responsable est souvent à l'origine du potentiel toxique d'une molécule. Les modèles hépatocytaires humains sont donc souvent privilégiés pour évaluer le métabolisme des xénobiotiques et leur hépatotoxicité.

1.3.1. Les cultures primaires d'hépatocytes humains

La culture primaire d'hépatocytes humains constitue le modèle d'étude *in vitro* le plus pertinent pour le métabolisme et la toxicité des xénobiotiques (Guillouzo et al., 2008). La culture d'hépatocytes humains se décline en de nombreux modèles *in vitro* présentant des caractéristiques expérimentales de mise en œuvre et d'applications très variables.

La mise au point de méthodes standardisées et très efficaces d'isolement d'hépatocytes dans les années 80 a permis de disposer d'une population purifiée d'hépatocytes (Guguen-Guillouzo et al., 1982) utilisée pour développer différentes conditions de culture primaire. La plus simple et la plus souvent utilisée est la culture pure d'hépatocytes. Classiquement, les hépatocytes sont cultivés dans des milieux adaptés aux cellules épithéliales tels que le milieu William's E. Ils adhèrent au support des flacons de culture en présence de sérum de veau foetal ou sur les matrices extracellulaires préalablement disposées sur la surface d'ensemencement. A faible densité ($<5.10^4$ cellules/cm²) et en milieu de base, les hépatocytes humains ou murins meurent rapidement par apoptose (Gilot et al., 2002). L'ensemencement à forte densité ($>10^5$ cellules/cm²) dans un milieu supplémenté en insuline, glucocorticoïdes (Guillouzo et al., 1990) ou encore en DMSO (Isom et al., 1985) permet de maintenir la viabilité et la différenciation hépatocytaire pendant plusieurs jours. D'autres modèles plus complexes ont permis d'améliorer encore la survie et le niveau de différenciation en particulier la culture pure en matrices extracellulaires complexes (sandwich de collagens ou matrigel®) (Bissell et al., 1987) et l'association d'hépatocytes avec des cellules épithéliales biliaires de rat formant une modèle de coculture particulièrement stable (Guguen-Guillouzo et al., 1983).

Une alternative à la culture primaire d'hépatocytes isolés est le modèle de « tranches » de foie basé sur la préparation de disques fins de tissus hépatiques d'environ 5 millimètres de diamètre et de 250 micromètres d'épaisseur (Krumdieck et al., 1980). Ce modèle a été largement optimisé et permet une utilisation sur au moins 3 à 4 jours avec un bon maintien de la survie et de la différenciation hépatocytaire (Finot et al., 2012). Il a été particulièrement utilisé pour évaluer la toxicité sélective intralobulaire et l'interaction fonctionnelle entre les différents types cellulaires hépatiques (Vickers et al., 2004; Vickers et al., 2011).

Cependant, ces modèles présentent différents inconvénients qui en limitent une large utilisation. Dans ces modèles, les hépatocytes humains prolifèrent peu ou pas du tout et présentent souvent un phénotype instable lié en partie une variabilité interindividuelle importante. Enfin, la disponibilité aléatoire des prélèvements humains et la mise en œuvre délicate de ces modèles ont réduit le nombre de laboratoires en mesure de les utiliser.

1.3.2. Les lignées cellulaires

Les lignées hépatocytaires qu'elles soient transformées ou d'origine tumorale, possèdent une capacité de prolifération illimitée mais n'expriment que très peu d'EMXs. Cela est particulièrement vrai dans le modèle HepG2 ne conservant que très peu de fonctions hépatique, exception faite des isoformes fœtales des CYPs (CYP1A1 et CYP3A7). Notons cependant qu'en fonction de son origine et des conditions de culture utilisées, l'expression des fonctions hépatiques peut varier significativement au sein de ce modèle (Rodríguez-Antona et al. 2003; Westerink et al., 2007a; Westerink et al., 2007b; Hewitt, 2004). L'étude de Jover et al. (1998) démontre qu'une transfection stable permettant l'expression de C/EBP α au sein de cette lignée permet une réexpression des CYP2B6, CYP2C9 et CYP2D6. D'une manière générale, l'absence d'expression des EMXs peut être compensée par des systèmes de cellules recombinantes dans lesquelles une ou des expressions stables des EMXs ont été réalisées par transfert de gènes (Hashizume et al., 2010). Cependant, l'utilisation de promoteurs « artificiels » rend ces modèles inadaptés aux études d'induction et de régulation des EMXs. Le modèle de cellules d'hépatome HepaRG fait figure d'exception puisqu'il est le seul à présenter un phénotype hépatocytaire bien différencié.

a. La lignée HepaRG

La lignée d'hépatome humain HepaRG constitue un modèle de cellules hépatocytaires particulièrement original du fait de son fort potentiel prolifératif à faible densité et de la capacité de ces cellules à engager un programme de différenciation à confluence (Gripon et al., 2002b; Cerec et al., 2007). Cette lignée dérivée d'un hépatocarcinome humain est constituée de cellules progénitrices bipotentes qui prolifèrent activement après repiquage puis, à confluence, vont s'engager soit vers un phénotype hépatocytaire soit vers un phénotype biliaire. De plus, après confluence et initiation de la différenciation, l'addition de 2 % de DMSO potentialise fortement le phénotype hépatocytaire. Ainsi, après deux semaines de prolifération et confluence puis deux semaines de différenciation en présence de DMSO (figure 9a), une population de cellules ayant des caractéristiques fonctionnelles et morphologiques d'hépatocyte en culture primaire et formant des colonies est visible, entourée d'une seconde population similaire aux cellules biliaires (figure 9b).

Dans les hépatocytes, la différenciation peut être objectivée par l'expression de fonctions hépatiques. A titre d'exemple, l'albumine est fortement exprimée dans les cellules HepaRG engagées dans la voie hépatocytaire dès la seconde semaine de culture. Après le repiquage, son expression décroît lors de la phase la plus active de prolifération (jours 1 à 4) et n'est pas affectée par l'ajout du DMSO. A l'inverse, l'expression des CYP3A4 et CYP2E1 n'est que faiblement détectable durant les deux premières semaines de culture et c'est l'addition du DMSO qui induit fortement leur expression.

De plus, l'expression des RNs et la stabilité fonctionnelle sur plusieurs semaines de cette lignée en font un modèle pertinent pour l'étude du métabolisme et de la toxicité chronique des xénobiotiques (figure 9c) (Guillouzo et al., 2007; Jossé et al., 2008; Aninat et al., 2006).

Au cours de mon travail de thèse, j'ai principalement utilisé le modèle des cellules HepaRG soit pour en valoriser l'utilisation soit pour poursuivre sa caractérisation. J'ai choisi de ne pas le décrire plus avant dans cette introduction mais de détailler différents aspects de ses caractéristiques dans les différents chapitres du travail expérimental.

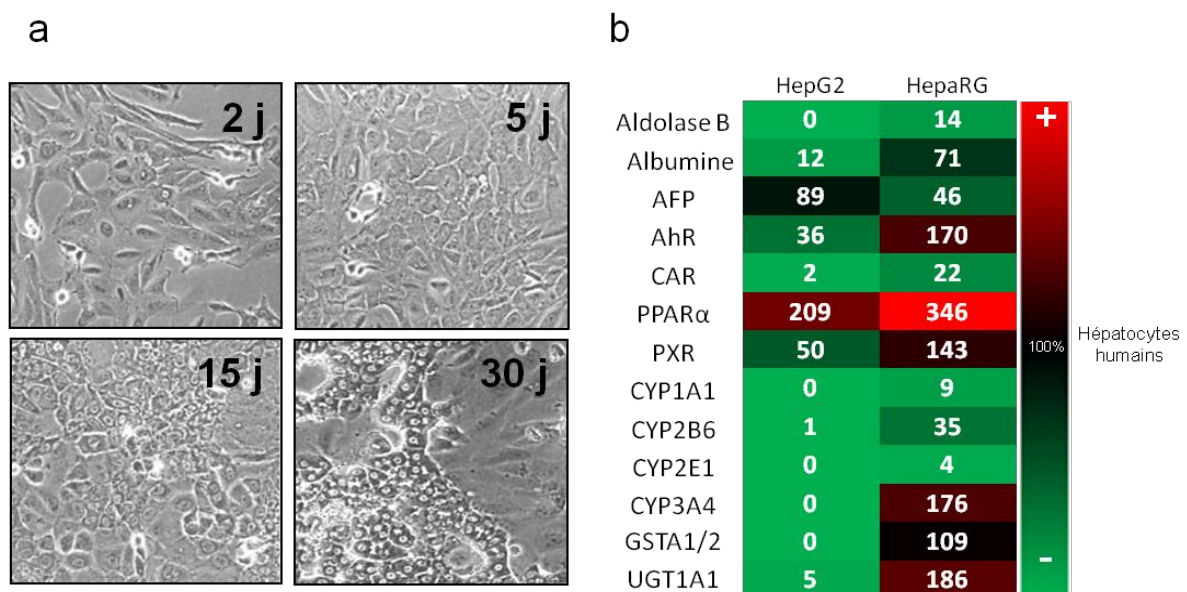


Figure 9 : Caractéristiques du modèle HepaRG . (a), Photos à 2, 5 et 15 jours de prolifération en absence de DMSO, et à 30 jours après différenciation en présence de DMSO. A 30 jours, deux populations cellulaires sont visibles, les hépatocytes-like en surbrillance et les cellules biliaires-like. (b), Expression relative (%) des ARNm de divers marqueurs et fonctions hépatocytaires des modèles HepG2 et HepaRG différencié comparé aux hépatocytes humains fraîchement isolés. D'après Aninat et al. (2006)

2. La carcinogénèse

Le maintien de l'intégrité du génome constitue un enjeu majeur pour la cellule. En effet, malgré la stabilité relative que lui confèrent ses caractéristiques physico-chimiques, l'ADN est la cible constante de nombreuses agressions d'origine chimique ou physique nuisant à son intégrité. Les lésions conduisent le plus souvent à un arrêt du cycle cellulaire ou à l'apoptose selon leur sévérité. Dans certains cas, lorsqu'elles sont répétées sur plusieurs années, ces lésions peuvent aboutir à des modifications génétiques persistantes initiant la tumorigénèse par la perte des points de contrôle du cycle cellulaire et l'acquisition de mécanismes de résistance à l'apoptose.

La carcinogénèse est un processus généralement subdivisé en 3 grandes phases : l'initiation, la promotion et la progression, qui aboutissent à la formation d'un néoplasme. L'initiation tumorale consiste en la formation de lésions définitives de l'ADN (mutations ponctuelles, délétions et remaniements chromosomiques) suite à une exposition à des agents génotoxiques (HAP, rayonnements UV, virus, etc.).

La promotion n'induit pas de lésion mais en favorise l'expression et conduit à l'expansion clonale de la cellule. Les facteurs responsables de la promotion (hormones, inflammation chronique, etc.) ne sont généralement pas mutagènes ni indispensables à la tumorigénèse, mais participent à la création d'un environnement favorable au développement tumoral.

Enfin, l'étape de progression correspond à l'acquisition de propriétés communes à toutes les cellules tumorales :

- indépendance partielle vis-à-vis des signaux de prolifération
- insensibilité aux signaux anti-prolifératifs
- résistance à l'apoptose

Cette capacité de prolifération illimitée peut être associée à d'autres caractères, comme la capacité de diffusion métastatique et d'induction de l'angiogénèse, qui contribuent à l'apparition d'un phénotype tumoral agressif.

2.1. La carcinogénèse hépatique

Les cancers primitifs du foie sont de nature variée et peuvent se développer à partir de différents types cellulaires normalement présents dans le foie. Cependant, le carcinome

hépatocellulaire (CHC) issu de la transformation des hépatocytes, est une des tumeurs les plus fréquentes dans le monde (5^{ème} rang mondial) et son incidence continue d'augmenter sous l'influence de l'hépatite C et des cirrhoses d'origine métabolique. La population à risque est constituée de sujets atteints de maladies chroniques du foie d'origine virale (VHC, VHB), toxique (AFB1, alcoolisation chronique), métabolique ou génétique (hémochromatose) parvenues au stade de fibrose extensive ou de cirrhose. À ces stades, les CHC ont une incidence annuelle variant de 2 à 5 % et sont responsables en France d'environ 6 000 décès par an. Avec un dépistage souvent tardif et malgré l'évolution des thérapies et des méthodes diagnostiques, le pronostic du CHC reste sombre (El-Serag and Rudolph 2007).

Seuls 10 % des CHC se développent sur foie sain, l'étiologie du CHC est donc étroitement liée à des lésions chroniques du foie. Une explication partielle réside dans la capacité unique que possède cet organe à se régénérer. En effet, deux facteurs importants favorisent la création d'une tumeur : la création répétée de lésions moléculaires qui permettent l'initiation, et la prolifération cellulaire. Cette dernière est une capacité endogène du foie et participe à la formation de nodules de régénération caractéristiques des foies cirrhotiques. Ces nodules peuvent dégénérer vers un état préneoplasique précédant la formation du CHC (El-Serag et al., 2007).

D'un point de vue mécanistique, nous pouvons faire la distinction entre deux classes de carcinogènes. D'une part, les génotoxiques réactifs vis-à-vis de la molécule d'ADN et responsables de l'initiation et d'autre part, les carcinogènes non-génotoxiques qui agiront sur d'autres cibles moléculaires et sur les modifications épigénétiques. En réalité, le potentiel carcinogène des xénobiotiques découle quasi systématiquement d'une synergie de ces deux mécanismes. Dans le chapitre suivant, je me propose de développer les différentes sources d'altérations génotoxiques impliquées dans l'étape d'initiation ; ensuite, nous aborderons les mécanismes impliqués lors de la promotion tumorale.

2.2. Altérations génétiques et moléculaires liées au CHC

2.2.1. Les sources d'altérations génétiques

Les altérations génotoxiques désignent les modifications de base, comme l'oxydation, la formation de sites abasiques ou la dimérisation de bases ; les modifications de séquences

nucléotidiques comme les mutations ponctuelles, délétions et insertions ; ainsi que les cassures simple et double brin.

a. Les espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène sont des atomes ou molécules contenant un électron non apparié, leur conférant une extrême instabilité. Ces EROs ont la capacité de réagir avec les molécules les plus stables telles que les protéines, les lipides membranaires et l'ADN. Parmi les molécules répondant au nom d'EROs, nous pouvons citer l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}), mais aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Il existe un nombre important de sources endogènes d'EROs qui peuvent être modulées selon l'état physiopathologique. Parmi celles-ci, la mitochondrie génère ces espèces réactives principalement *via* les complexes I et II de la chaîne respiratoire mais aussi *via* d'autres enzymes telles que la monoamine oxydase, la kétoglutarate déshydrogénase et la glycérol-phosphate déshydrogénase (Starkov et al., 2004; Starkov, 2008). Il est communément admis que la mitochondrie représente la principale source cellulaire d'EROs (Balaban et al., 2005). Cependant, la détermination des contributions relatives des organites cellulaires dans la production d'EROs doit tenir compte de plusieurs paramètres : le type d'ERO, variable en qualité et en quantité en fonction de l'organelle ; le type cellulaire qui conditionne les proportions des différents organites ; et les systèmes enzymatiques anti-oxydants comme la catalase, les superoxyde dismutases ou encore les glutathion peroxydases. C'est ce que rappelle une rétrospective de 2012 par Brown et Borutaite remettant en question le fait que la mitochondrie soit la principale sources d'EROs en comparaison avec d'autres sources telles que le réticulum endoplasmique (RE) *via* les CYPs et leur cycle catalytique responsable de la production d' $O_2^{\bullet-}$ et de H_2O_2 ou les peroxysomes, *via* l'oxydation des acides gras.

Les dommages oxydatifs de l'ADN incluent les cassures simple et double brin, l'oxydation des bases et des sucres de la molécule. Il existe une très grande variété de lésions oxydatives de l'ADN. La plus étudiée d'entre elles est la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG), produite par l'hydroxylation en carbone C8 de la guanine. Elle est utilisée comme biomarqueur de stress oxydatif (Valavanidis et al., 2009) et est hautement mutagénique. Concernant les bases pyrimidiques, la lésion la plus fréquente est la thymine glycol.

L'association entre l'exposition aux polluants et l'augmentation du stress oxydant a été clairement établie (Shertzer et al., 1998) *in vitro* et *in vivo* par suivi des marqueurs de stress oxydatif comme la 8-oxodG ou encore la quantification du glutathion oxydé. La production d'EROs par les xénobiotiques peut être indirecte. Tel est le cas pour bon nombre de polluants organiques souvent inducteurs de leur propre voie de détoxification *via* les CYPs ; or, ces enzymes sont capables de générer des EROs et contribuent en grande partie au stress oxydatif issu du réticulum endoplasmique. La production d'EROs peut être également directe comme c'est le cas pour les métaux tels que le fer, le cuivre, le chrome ou encore le cobalt, qui ont la capacité de produire des radicaux hydroxyles *via* la réaction de Fenton.

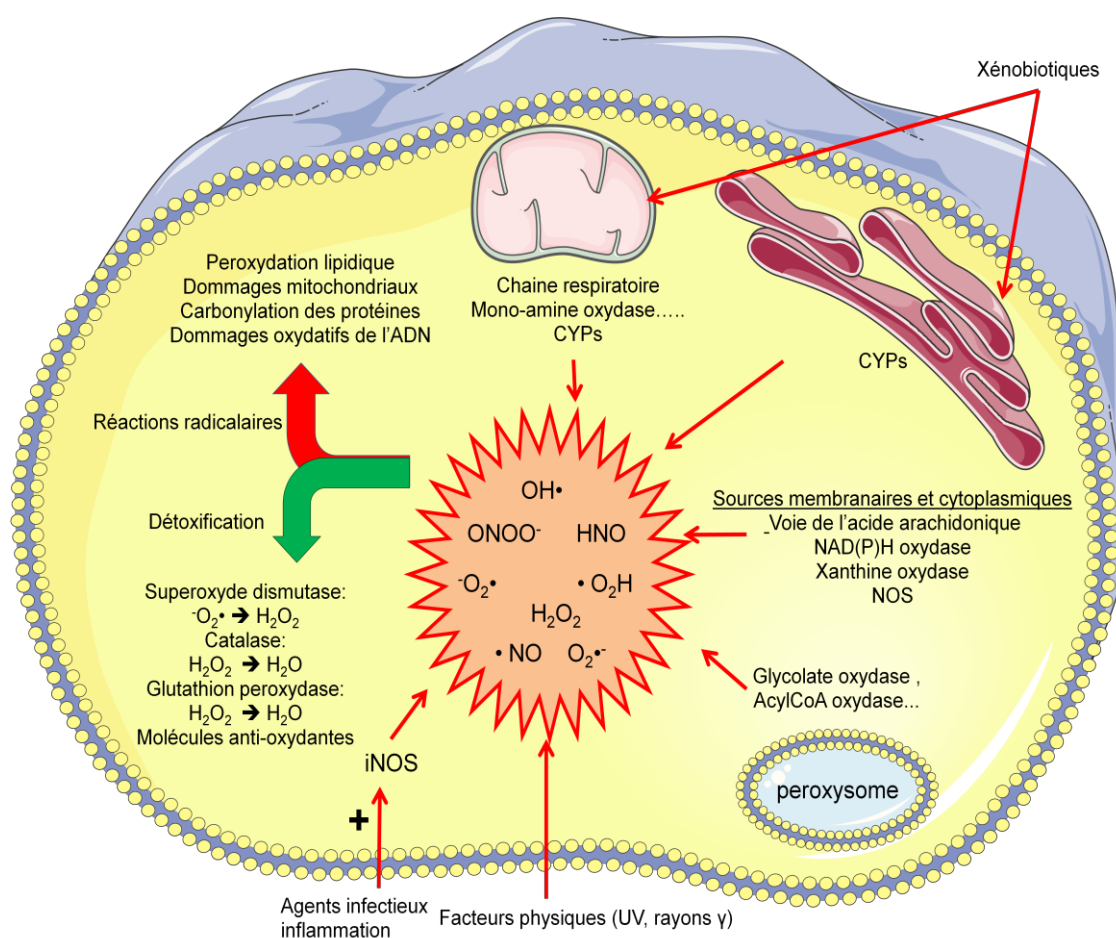


Figure 10 : Principales sources d'espèces réactives de l'azote et de l'oxygène. Au niveau hépatique, les EROs et les ERNs sont produites par les polynucléaires neutrophiles, les cellules de Kupffer et les hépatocytes. Les principaux organites impliqués sont la mitochondrie, le réticulum endoplasmique grâce aux CYPs et les peroxysomes. De nombreux mécanismes permettent la détoxification de ces molécules réactives : les mécanismes enzymatiques incluant la catalase, la glutathion peroxydase et la superoxyde dismutase. De nombreuses molécules endogènes ont également un pouvoir antioxydant telles que la bilirubine, la mélatonine ou le coenzyme Q. (Diesen et al., 2010)

b. Les espèces réactives de l'azote

Les espèces réactives de l'azote (ERN) telles que le peroxy-nitrite (ONOO^-), le nitroxyde (HNO) et le dioxyde d'azote (NO_2) peuvent causer de multiples dommages à l'ADN comme l'alkylation, la désamination, l'oxydation et la nitration des bases nucléiques. Ces molécules dérivent de l'oxyde nitrique (NO) produit lors d'une réaction inflammatoire par l'isoforme inducible de l'oxyde nitrique synthase (iNOS). Cette enzyme est capable de produire du NO pendant une période prolongée, ayant un effet protecteur sur la cellule et un rôle défensif vis-à-vis des pathogènes (Granger et al., 1988; James, 1995). Cependant, le NO a également des effets délétères au travers des dommages oxydatifs et nitratifs qu'il produit sur les macromolécules. La surexpression d'iNOS est observée dans certaines maladies à caractère inflammatoire telles que la maladie de Crohn (Singer et al., 1996) ou encore lors d'hépatites virales (Kandemir et al., 2002), et est associée à un risque accru de cancer dû à son rôle dans la progression tumorale (Fukumura et al., 2006).

c. Les alkylations

Les agents alkylants ont la capacité de réagir avec les atomes d'azote et d'oxygène des acides nucléiques. Ces lésions sont génotoxiques et cytotoxiques, cependant, les O-alkylations de la thymine et de la guanine sont plus mutagènes que les N-alkylations (Margison et al., 2002). La plus fréquente est la 7-alkyl-guanine qui conduit à la formation de sites abasiques par dépurination spontanée et lors du processus de réparation. Certains agents alkylants dits bi-fonctionnels génèrent des lésions plus complexes comme des liaisons intra et inter-brins.

Les agents alkylants comme les nitrosamines sont ubiquitaires. Ils sont produits de manière endogène, mais sont aussi présents dans l'environnement. L'alimentation est une source importante de précurseurs de nitrosamines comme les nitrates, qui résultent d'une contamination par les fertilisants azotés ou de l'utilisation de nitrates et de nitrites (E252, E249, E250) comme conservateurs alimentaires. Les bactéries de la muqueuse buccale vont en réduire une fraction importante en nitrites qui formeront, au contact du pH acide de l'estomac, différentes espèces nitrées telles que HNO_2 , N_2O_3 et NOSCN pouvant former des composés N-nitrosés.

2.2.2. Les altérations non-génotoxiques

Lors du développement carcinogénique, la prolifération incontrôlée et la dérégulation du cycle cellulaire peuvent être induites par un ensemble de mécanismes variés. Par exemple, les voies de transduction du signal sont souvent modifiées, conduisant à des réponses démesurées aux hormones et autres cytokines. Cette section décrit brièvement quelques-uns de ces mécanismes.

a. Effet récepteur dépendant

Les polluants ont la capacité d'activer différents récepteurs tels que les récepteurs aux xénobiotiques comme AhR, mais également des récepteurs hormonaux. Si les premiers permettent à la cellule de développer une réponse adaptée afin d'éliminer les polluants, les seconds sont des récepteurs de composés endogènes. La fixation de polluants produit une réponse illégitime induisant une perturbation endocrinienne. Les récepteurs aux xénobiotiques ayant sous leur contrôle de nombreux gènes tels que les EMXs, des gènes de régulation du développement et de la prolifération, les perturbations endocriniennes peuvent être responsables de nombreux effets incluant la carcinogénèse.

b. Inhibition de la communication intercellulaire *via* les jonctions GAP

Les jonctions GAP sont des canaux présents sur la membrane plasmique permettant des échanges contrôlés entre deux cellules adjacentes. Elles sont composées de deux hémicanaux, les connexons, chacun composé de 6 sous-unités protéiques appelées les connexines (Cx). Ces structures permettent l'échange de petites molécules (glucose, calcium, facteurs de croissance, AMPc, inositol tri-phosphate) entre les cellules et jouent un rôle essentiel dans le développement et l'homéostasie des tissus au travers d'un grand nombre de partenaires cellulaires (Trosko et al., 1998). La formation de ces canaux dépend non seulement de la régulation transcriptionnelle, traductionnelle et post-traductionnelle des Cx, mais également de leur oligomérisation et adressage à la membrane plasmique ainsi que de la dimérisation des connexons entre cellules adjacentes. La perméabilité de ces canaux est contrôlée par de mécanismes instantanés comme le potentiel de membrane ou les flux de protons et de Ca^{2+} (Cottrell et al., 2005), mais elle dépend également de la nature des Cx qui composent la jonction. En effet, l'expression des Cx est dépendant du type cellulaire, par exemple, la Cx32 représente 90 % des Cx de l'hépatocyte alors que la Cx43 est majoritaire

dans les cellules de Kupffer et les cellules de la capsule de Glisson. La Cx32 est beaucoup plus perméable aux anions alors que la Cx43 permet un transfert d'ATP 300 fois supérieur. Dans l'hépatocyte, un grand nombre de carcinogènes (chlordanes, CCl₄, DDT) ainsi que les agonistes de PPAR α (Wy-14.643) ont la capacité d'inhiber ces jonctions à différents niveaux de leur synthèse (Tateno et al., 1994; Mally et al., 2002).

Il existe de nombreux toxiques capables de moduler les jonctions GAP tel que les HAP, le lipopolysaccharide (LPS), certaines mycotoxines comme la patuline ou encore les pesticides organosphorés. Parmi les HAP, le benzène ou du moins son métabolite, le *trans,trans*-muconaldéhyde induit une inhibition des jonctions GAP en créant des pontages covalents sur la Cx43 (Rivedal et al., 2008) et en induisant sa phosphorylation par ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinases).

c. Raccourcissement des télomères

Les télomères sont des complexes nucléoprotéiques situées aux extrémités des chromosomes et contenant des répétitions en tandem TTAGGG. Dans les cellules saines, ces structures sont vulnérables et se raccourcissent progressivement à chaque cycle de réplication. Le raccourcissement des télomères est limité par les télomérases qui permettent une élongation contrôlée de ces structures dans les cellules saines. Elles jouent ainsi un rôle prépondérant dans le vieillissement et la sénescence répllicative, mais exposent les cellules à un risque d'instabilité chromosomique de plus en plus élevé avec l'âge. Lors d'un cancer, le gène *TERT* (Human Telomerase Reverse Transcriptase) codant pour la télomérase, est fortement activé dans plus de 90 % des cas et confère aux cellules tumorales une capacité de croissance illimitée (Heidenreich et al., 2014).

d. Les modifications épigénétiques

L'épigénèse est un mécanisme d'altération du génome sans modification de la séquence d'ADN reposant sur la méthylation de l'ADN, l'acétylation des histones de la chromatine et la dérégulation par les micro-ARN. Ces mécanismes sont cruciaux pour le développement, la différenciation et l'expression organotypique des gènes. Un dysfonctionnement de ces voies de régulation conduira à une expression ou à une répression inappropriée des gènes cibles conduisant à un changement de phénotype pouvant au même titre que les mutations perdurer sur plusieurs générations cellulaires.

➤ Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est un mécanisme épigénétique permettant de contrôler l'expression des gènes en modifiant l'organisation de la chromatine. Elle se produit par transfert du groupement méthyle de la S-adénosyl-L-méthionine sur le carbone 5 de la cytosine, formant ainsi la 5-méthyl-cytosine. Dans les cellules somatiques, 70 à 90 % des régions riches en dinucléotides CG appelées « îlots CpG », sont méthylées (Lister et al., 2009) et se retrouvent dans les régions intra et intergénique ainsi qu'en partie 5' terminale des gènes. La plus grande proportion d'îlots CpG non méthylés se retrouve dans les régions promotrices. L'hyperméthylation des régions promotrices conduit à une inhibition transcriptionnelle des gènes associés. Lorsque des gènes suppresseurs de tumeur, comme l'inhibiteur de protéines kinases dépendantes de cycline *CDKN2A*, Secreted Frizzled Related Protein (*SFRPs*) ou encore l'Adénomateux Polyposis Coli (*APC*) (Sriraksa et al., 2011; Kaur et al., 2012) sont concernés par cette extinction, cela conduit à une expansion clonale et à une survie anormale des cellules (Baylin et al., 2011). À l'inverse, l'implication de l'hypométhylation dans le cancer a été plus difficile à démontrer car la majorité des îlots CpG des régions promotrices ne sont pas méthylés. Cependant, des études montrent que physiologiquement, certains gènes contiennent des îlots CpG méthylés au sein de leur promoteur (Shen et al., 2007). Ce phénomène concerne plusieurs gènes dits « pro-oncogènes », tels que les gènes de la S100 calcium binding protein A4 (*s100A4*), l'urokinase, l'héparanase, la synucléine- γ , qui sont retrouvés associés à de nombreux cancers humains (Pogribny et al., 2009).

➤ Modifications post-traductionnelles des histones

Les histones sont des protéines associées à l'ADN, formant un complexe octamérique sur lequel l'ADN s'enroule pour former le nucléosome. Ce dernier est l'unité constitutive de la chromatine dont on peut distinguer deux formes : l'euchromatine, faiblement compactée permettant ainsi la transcription ; et l'hétérochromatine qui elle est fortement compactée, limitant alors la transcription. La densité de la chromatine est contrôlée par des modifications post-traductionnelles des histones telles que la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation et l'ubiquitinylation. Un déséquilibre dans ces modifications participera à l'apparition d'un phénotype malin (Thompson et al., 2013).

➤ Les microARN

Les microARN (miRNAs) appartiennent à la famille hétérogène des ARN non-codants courts et permettent la régulation de l'expression d'environ 30 % des gènes humains. Transcrits dans le noyau par l'ARN polymérase II, les miRNAs immatures sont transloqués dans le cytoplasme par les exportines 5 avant d'être clivés en fragments de 18 à 24 nucléotides par l'endonucléase DICER. Le brin non codant de ce duplex sera ensuite incorporé dans le complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complexe) qui guidera les miRNAs matures jusqu'à leurs ARNm cibles. La liaison du complexe RISC avec l'ARNm conduira à la dégradation de ce dernier (Stroynowska-Czerwinska et al., 2014). Les miRNAs sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme le développement et la différenciation, et jouent un rôle important dans la régulation de l'expression des proto-oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur. Dans la carcinogénèse hépatique, certains miRNAs sont pro-oncogènes comme le miRNA-221, qui induit une perte des points de contrôle du cycle cellulaire en ciblant l'expression de l'inhibiteur des CDKs p27/Kip1 et le miRNA-9 ciblant l'ARNm de l'E-cadhérine en augmentant la motilité des cellules tumorales (Laios et al., 2008; Zhu et al., 2012; Rong et al., 2013). À l'inverse, certains miRNAs sont réprimés dans les hépatocarcinomes comme le miRNA-124 (Furuta et al. 2010; Xiao et al., 2014). Celui-ci exerce son effet anti-oncogène en ciblant la protéine Kinase Dépendante des Cyclines 6 (CDK6). L'inhibition de cette protéine kinase favorise l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et stimule la voie pro-apoptotique en permettant l'accumulation de la protéine p53. Il a été démontré que l'expression des miRNAs est régulée fréquemment par la méthylation de l'ADN et dans une moindre mesure par la modification des histones. De plus, un miRNA a souvent plusieurs ARNm cibles, ce qui ajoute un niveau de complexité supplémentaire dans la compréhension des mécanismes épigénétiques.

Les dommages génotoxiques jouent un rôle essentiel dans la carcinogénèse mais de par leur nature, rendent les xénobiotiques impliqués facilement identifiables par les méthodes de toxicologie actuelles. À l'opposé, les carcinogènes non-génotoxiques impliquent des mécanismes complexes souvent indirects et hétérogènes. De plus, pour aboutir à la formation de lésions persistantes, ces molécules nécessitent souvent une exposition chronique sur de longues périodes. Ces différents paramètres contribuent à rendre leur détection difficile sans l'aide d'études *in vivo*.

3. Evaluation du risque carcinogénique et génotoxique

3.1. Stratégie actuelle en Union Européenne

La première étape dans l'évaluation du risque carcinogénique en pré-clinique passe par la réalisation d'une batterie classique de tests *in vitro* permettant d'évaluer les risques mutagéniques, aneugéniques et clastogéniques. Parmi les événements conduisant à la carcinogénèse, la mutagénicité qualifie la capacité d'une molécule à modifier la séquence génétique par substitution, délétion ou insertion d'une paire de base. L'aneugénicité se réfère à la capacité d'une molécule à créer des anomalies numériques (gain ou perte) de chromosome. La clastogénicité quant à elle, évoque des altérations qualitatives dans la structure des chromosomes, faisant suite à des cassures de brins par exemple. La batterie de tests *in vitro* standard comprend le test d'Ames, les tests d'aberration chromosomique et de mutation génique sur cellules de mammifères, ainsi que le test des micronoyaux.

Selon la nature du produit testé et en fonction des résultats obtenus *in vitro*, des tests *in vivo* pourront être conduits. En effet, depuis le 11 mars 2013, date d'entrée en application de la directive EC 1223/2009, plus aucun cosmétique ne peut être commercialisé au sein de l'Union Européenne si le produit fini ou un de ses ingrédients a fait l'objet de tests sur des animaux. À l'inverse, la réalisation de tests *in vivo* pour les produits chimiques industriels et les produits biocides seront effectués uniquement en cas de résultats positifs ou douteux à au moins l'un des tests *in vitro*. Seules les substances pharmaceutiques, vétérinaires et phytopharmaceutiques seront systématiquement évaluées par des tests *in vivo* indépendamment des résultats obtenus *in vitro*.

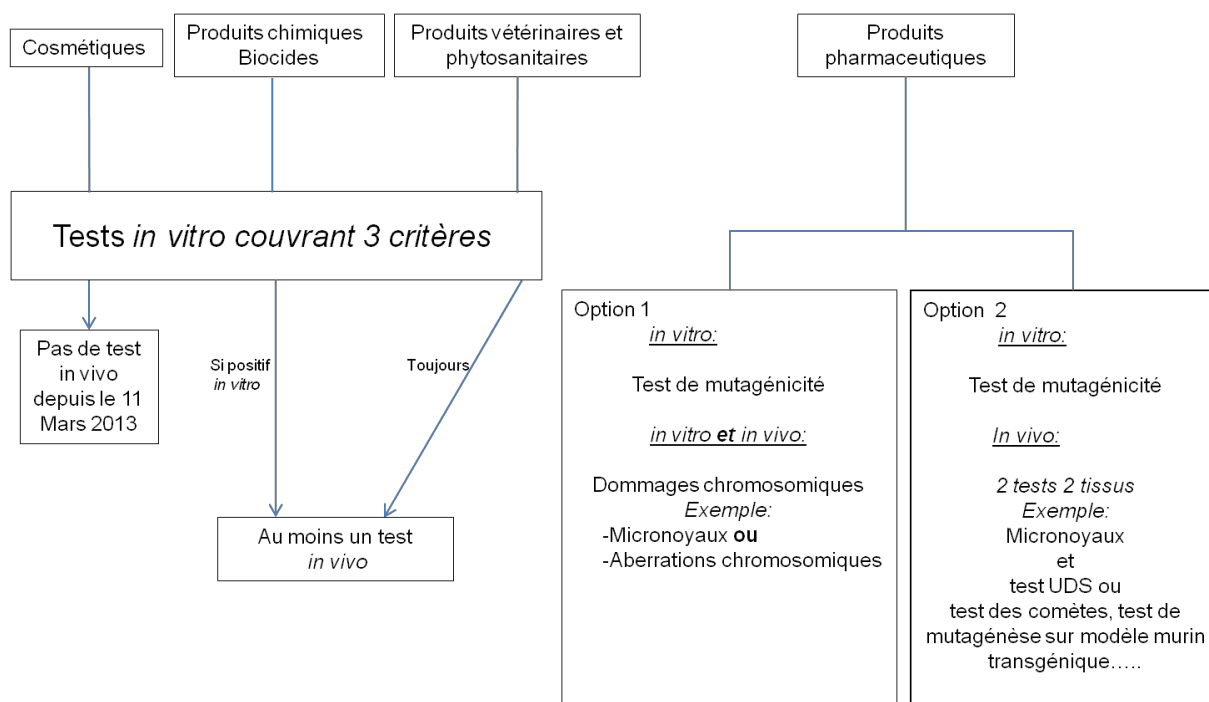


Figure 11 : Stratégie d'évaluation de la génotoxicité. version modifiée du rapport de l'EURL ECVAM « strategy to avoid and reduce animal use in genotoxicity testing » (2013); UDS, unscheduled DNA synthesis.

- Cas particulier des biocides et substances phytopharmaceutiques :

Les biocides et les substances phytopharmaceutiques sont régulés par deux directives différentes : 98/8/CEE et 91/414/CEE. Pourtant, de nombreux produits peuvent tomber dans le champ d'application de ces deux directives. Les substances phytopharmaceutiques sont définies comme étant des produits destinés à protéger les végétaux ou leurs produits, par destruction exclusive et spécifique de(s) l'organisme(s) nuisible(s). Les biocides sont simplement définis comme étant des substances ayant pour objectif de détruire les organismes nuisibles indépendamment de la nature du produit à protéger. Par exemple, les rodenticides utilisés en dehors des aires de culture végétale (ville, bâtiments industriels, etc.) sont considérés comme des biocides. Inversement, s'ils sont utilisés dans les aires de culture ou dans des zones de stockage de produits végétaux, ils sont à considérer comme des produits phytosanitaires. Des documents d'orientation ont été rédigés par la Commission Européenne afin de définir les cas limites et de permettre une mise en œuvre correcte de ces directives. (http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/borderline_fr.htm).

Pour le moment, que ce soit lors des phases précoces du développement ou lors de la réalisation des études réglementaires, les méthodes *in vitro* ne peuvent se substituer aux

études *in vivo* (Adler et al., 2011). Cependant, afin de se conformer aux exigences du règlement REACH qui requiert des résultats fiables et rapides sur les propriétés toxiques des substances chimiques mais également dans une démarche éthique, le développement de méthodes alternatives à l'expérimentation animale est aujourd'hui une priorité. De plus, l'adoption du 7^{ème} amendement de la directive cosmétique a fortement stimulé l'innovation dans ce domaine. Les méthodes alternatives doivent permettre de satisfaire un ou plusieurs principes de la règle des 3R à savoir, réduction, raffinement et remplacement. Le raffinement des méthodes passe par la réduction de la douleur chez l'animal en développant des méthodes d'examen et d'imagerie non invasives (IRM, ultrasons, bioluminescence, etc.). Les méthodes de réduction ciblent l'optimisation des modèles animaux (modèles transgéniques ou non, choix d'espèces plus pertinentes), des méthodes statistiques, le développement des méthodes « OMICS » et l'utilisation de stratégies de tests intégrés. Quant aux méthodes de substitution, l'optimisation des techniques *in vitro* et le développement de modèles *in silico* en sont les axes de recherche principaux.

3.2. Méthodes *in vitro* d'évaluation du risque génotoxique

3.2.1. Optimisation des méthodes existantes

a. Le test des micronoyaux

Un micronoyau est un fragment d'ADN génomique organisé sous forme sphérique, situé à proximité du noyau principal de la cellule et dont la taille est au moins 3 fois inférieure. La présence de cassures sur les chromosomes ou un dysfonctionnement de la ségrégation chromosomique lors de la mitose sont les deux mécanismes principaux pouvant conduire à la formation d'un micronoyau. En effet, les cassures générées par les agents clastogènes vont conduire à la formation d'un fragment chromosomique dépourvu de centromère qui sera directement inclus dans un micronoyau. Mais dans le cas d'un dysfonctionnement de l'appareil mitotique, les micronoyaux seront constitués de chromosomes entiers résultant d'une mauvaise ségrégation lors de l'anaphase et conduisant à une aneuploïdie des cellules filles. Un dysfonctionnement de l'appareil mitotique peut résulter de diverses altérations telles que la formation de chromatides dicentriques ou une union de celles-ci.

Initialement, seul le test *in vivo* sur érythrocytes de mammifères avait été approuvé par l'OCDE (OCDE LD474) en 1983. Le dénombrement était fait le plus souvent sur des prélèvements de moelle osseuse ou de sang périphérique chez le rongeur. C'est seulement depuis 2010 que l'OCDE a approuvé l'utilisation *in vitro* de ce test sur cellules de mammifère en culture primaire (lymphocytes) ou de lignées cellulaires dans un cadre réglementaire. Ce délai s'explique en partie par les difficultés rencontrées dans la validation de ce test *in vitro*.

➤ **Le problème des faux positifs**

De manière générale, les tests *in vitro* actuels possèdent une bonne sensibilité mais présentent un taux élevé de faux positifs (spécificité) en comparaison aux données de carcinogénicité obtenues chez le rongeur (Kirkland et al., 2005). Ces résultats peuvent conduire à la réalisation précoce et injustifiée d'études *in vivo*, ce qui est un problème majeur en regard du règlement REACH et de la quantité de produits à tester.

Plusieurs études se sont donc intéressées à déterminer l'origine de ce taux élevé de faux positifs. Fowler et al. (2012) ont comparé sur différentes lignées cellulaires, un panel de composés dont certains sont connus pour donner des résultats faux positifs. De cette étude, plusieurs recommandations ont été émises notamment sur l'importance d'utiliser des lignées cellulaires humaines dont la voie de signalisation p53 n'est pas altérée. Cette protéine joue un rôle essentiel dans la réponse aux lésions de l'ADN, elle permet à la cellule de ralentir son cycle pour permettre la réparation de l'ADN, si les lésions sont trop importantes elle favorise la voie apoptotique et limite ainsi la persistance des lésions. L'utilisation de lignées déficientes pour P53 peut favoriser la persistance des cellules ayant subi une altération génotoxique et dès lors, favoriser une réponse positive. Il est donc recommandé d'utiliser les lignées HepG2, TK6 et HuLy, par rapport aux modèles murins ou encore de favoriser l'emploi de cellules exprimant les EMXs, comme les lignées hépatiques. Le choix des doses est également un facteur important ; celles-ci sont sélectionnées après évaluation de la cytotoxicité et il est admis qu'elles ne doivent pas induire une mortalité supérieure à $45\% \pm 5\%$. Plusieurs mesures comme le RCC (Relative Cell Counts), le RPD (Relative Population Doubling) ou encore le RICC (Relative Increase in Cell Counts) ont été évaluées en utilisant le modèle L5178Y. L'étude de Fellows et al. (2008) est arrivée à la conclusion que parmi ces paramètres, le RCC conduisait à surestimer la dose maximale admissible et qu'il fallait privilégier le RPD ou le RICC (Lorge et al., 2008; Fellows et al., 2008)

➤ La nécessité de développer et de valider de nouveaux modèles

Le modèle *in vitro* de l'œuf de poule embryonné présente un regain d'intérêt depuis quelques années pour son utilisation dans le cadre de l'évaluation génotoxique à l'aide du test des micronoyaux (Wolf et al., 1997). La substance à tester est directement appliquée sur la membrane allanto-chorionique très vascularisée, après incubation, les micronoyaux sont dénombrés dans les érythrocytes immatures circulants. Bien que ce ne soit pas un modèle humain, c'est un système complexe capable de reproduire les phases d'absorption, de distribution et d'activation métabolique (Bentivegna et al., 1998; Gilday et al., 1996), qui a fait l'objet de plusieurs études de validation (Hothorn et al., 2013) et semble être sur le point de devenir une alternative de choix aux tests du micronoyau *in vivo*. Ce test permet également d'approcher un mode d'exposition chronique sur au moins 3 jours (Greywe et al., 2012). Dans le cadre de l'évaluation des cosmétiques, des modèles permettant de prendre en compte le mode d'exposition se développent, comme les modèles de peau reconstituée (Curren et al., 2006). Les lignées couramment utilisées pour le test des micronoyaux sont les cellules CHO d'ovaire de hamster chinois et les cellules L5178Y (cellules issues d'un lymphome murin). En effet, ces cellules possèdent un caryotype stable et se prêtent bien à la réalisation de ce test. Cependant, elles sont dépourvues d'EMXs et impliquent l'utilisation de fractions microsomales S9 afin de prendre en compte l'activation métabolique. La grande variabilité entre deux préparations de microsomes, l'importante toxicité pour les cellules et le fait que cette activation soit réalisée en dehors de la cellule, limite l'intérêt de ces modèles (Kirkland et al., 2007).

C'est pour cette raison que les lignées cellulaires dérivées d'hépatomes humains devraient constituer une alternative attractive. Cependant, ces lignées n'expriment que très peu d'EMXs et ne représentent pas une alternative valable aux hépatocytes en culture primaire. Par exemple, la lignée HepG2 est fréquemment utilisée en toxicologie génétique mais celle-ci n'exprime que peu enzymes de phase I (Knasmüller et al., 1998; Uhl et al., 1999; Valentin-Severin et al., 2003). Même si ces cellules sont souvent à l'origine de lignées stables surexprimant spécifiquement certaines EMXs, elles n'en restent pas moins inappropriées puisque cette amélioration ne peut concerner que peu d'enzymes simultanément (Crespi et al., 1991).

Les cellules HepaRG dérivées d'hépatome humain (Gripon et al., 2002a), semblent particulièrement adéquates pour les études de génotoxicité (Le Hegarat et al. 2010; Jetten et al., 2013). Ces cellules expriment la majorité des EMXs de manière stable pendant plusieurs semaines lorsqu'elles sont différenciées, ce qui permet de réaliser des études chroniques (Jossé et al., 2008). Sous certaines conditions, ces cellules différenciées et quiescentes peuvent proliférer et être utilisées dans les tests des comètes et des micronoyaux (Jossé et al., 2012; Le Hegarat et al., 2010).

Les clones mutés dérivés de lymphocyte DT 40 méritent également d'être cités. En effet, il existe un grand nombre de ces mutants dont certains présentent une déficience spécifique en un système de réparation de l'ADN et ils peuvent permettre d'identifier le type de lésion impliquée (Ji et al., 2009).

3.2.2. Développement de méthodes basées sur de nouveaux critères d'évaluation

a. Le test de mutation du gène *PIG-A*

Il existe plusieurs tests de mutation génique initialement développés *in vivo* comme celui basé sur le gène de la glycophorine A exprimée dans les érythrocytes humains et utilisée comme biomarqueur d'exposition aux agents génotoxiques (Langlois et al., 1986). Cependant, le caractère autosomique de ce gène a rapidement limité son utilisation comme biomarqueur chez l'Homme. Aussi, le fait qu'il n'existe pas de système analogue chez l'animal a favorisé le développement d'autres tests comme ceux basés sur les gènes codant pour la thymidine kinase (TK), l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HPRT) ou encore pour le transgène de la xanthine-guanine phosphoribosyl transférase (XPRT) (OECD guideline 476). Ces tests sont réalisés sur des lignées cellulaires et imposent entre 18 et 22 jours de culture post-traitement pour permettre l'expression phénotypique et la formation de colonies.

Le gène *PIG-A* localisé sur le chromosome X code pour une enzyme (Phosphatidylinositol Glycan Anchor synthase) impliquée dans la première étape de biosynthèse du glycosylphosphatidyl inositol (GPI), une molécule d'ancrage membranaire (Hillmen et al., 1993). La suite de ce processus implique 21 autres gènes autosomaux. Chez le mâle, hémizygote pour les gènes du chromosome X, une mutation de *PIG-A* inactivera la protéine

et conduira à un phénotype vital mais déficient dans l'expression des protéines membranaires liées au GPI comme CD55 et CD59. Les deux phénotypes coexistent et peuvent être analysés par cytométrie en flux. Une mutation sur les autres gènes autosomiques impliqués conduira le plus souvent à l'expression du phénotype sauvage sauf si les deux allèles sont inactivés ou en cas d'hétérozygotie. Ainsi, le test de mutation sur le gène *PIG-A* présente le double avantage de limiter le temps de post-traitement à celui nécessaire à l'expression phénotypique et grâce à l'absence de phénotype létal, il prend en compte les délétions multi-loci à l'inverse du Mouse lymphoma assay-TK. Le gène *PIG-A* étant hautement conservé, ce test peut être réalisé sur modèle animal classique évitant l'utilisation coûteuse de modèles transgéniques (Dobrovolsky et al., 2010), sur modèles cellulaires comme les cellules TK6 (Krüger et al., 2014) ou encore servir de biomarqueur d'exposition chez l'Homme (Schuler et al., 2011).

b. Quantification de la phosphorylation de l'histone γ H2AX (test γ H2AX)

La protéine γ H2AX est un membre de la famille des histones H2A. Cette protéine contient en région C-terminale un motif SQ (sérine-glutamine) très conservé dans le règne du vivant. Rogakou et al. (1998) ont démontré que la sérine 139 de ce motif était phosphorylée immédiatement après l'induction de cassures double brin par les rayons gamma. Cette phosphorylation est réalisée par des enzymes de la famille des phosphatidylinositol 3-kinase-like kinase comme ataxia telangiectasia mutated (ATM), Rad3-related (ATR) et les protéines kinases ADN dépendantes (DNA-PK), impliquées dans la réponse aux dommages de l'ADN et la régulation du cycle cellulaire. Entre 5 et 30 minutes après la formation de cassures, la formation de phospho- γ H2AX atteint son niveau maximum et forme des foyers de quelques centaines à plusieurs milliers de molécules γ H2AX à proximité (1 mégabase environ) de l'altération, permettant le recrutement des facteurs impliqués dans la réparation de l'ADN. Ces foyers donnent en immunofluorescence un marquage punctiforme typique qui peut être quantifié par cytométrie en flux (Watters et al., 2009; Smart et al., 2011) ou par des méthodes à haut débit comme l'immunolocalisation indirecte et l'imagerie cellulaire (Audebert et al., 2012). Ce test peut être utilisé sur une large variété de cellules allant des cultures primaires aux lignées cellulaires d'origine humaine et animale bien que des sensibilités différentes puissent être observées en regard du contenu cellulaire en H2AX ou

du statut des différentes protéines kinases impliquées. L'utilisation de lignées cellulaires capables d'activation métabolique reste une prérogative majeure au choix du modèle.

Le test de la protéine γ H2AX a été largement utilisé dans l'évaluation du potentiel génotoxique de contaminants environnementaux comme les PAH ou les bisphénols A et F (Audebert et al., 2011; Audebert et al., 2012). Ce test a été en partie validé sur le modèle HepG2 à l'aide de 61 molécules recommandées par l'ECVAM et peut être utilisé en criblage toxicologique (Khoury et al., 2013). L'évaluation de la spécificité, sensibilité et de la transférabilité (Rothkamm et al., 2013) du test restent à réaliser avant son éventuelle intégration en toxicologie réglementaire. Il est également de plus en plus utilisé dans le suivi des radiothérapies ou dans l'évaluation clinique des chimiothérapies.

c. Induction des voies de stress et de dommages à l'ADN

La plupart des tests réglementaires comme le test de Ames, celui des micronoyaux et le MLA (Mouse Lymphoma Assay), sont des tests longs à réaliser et de ce fait, ils ne sont pas utilisables lors des phases de développement précoces et induisent un coût élevé lors de l'évaluation des produits imposés par REACH. Depuis quelques années, un nouveau type de tests basés sur des systèmes rapporteurs utilisant des modèles procaryotes et eucaryotes s'est développé. Parmi eux, les tests GreenScreen et DELL basés sur des levures recombinantes permettent respectivement de mesurer l'activation de la réponse aux dommages de l'ADN (selon le nom commercial, eGFP ou β -galactosidase sous le contrôle du promoteur du gène *RAD54*) ou de détecter une réversion de mutation. Cette stratégie a été transposée à des lignées cellulaires (HepG2, TK6, ES) en utilisant des promoteurs de gènes régulés par la protéine p53 comme *GADD45a* et impliqués dans la réponse au stress oxydant. Cependant, ces tests ne permettent pas la détection des carcinogènes non-génotoxiques (Westerink et al., 2010; Westerink et al., 2009; Birrell et al., 2010; Billinton et al., 2008; Johnson et al., 2013).

d. Activation des récepteurs nucléaires

Plusieurs approches permettent de déterminer si les récepteurs nucléaires sont modulés. Les systèmes acellulaires basés sur la polarisation de fluorescence et le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), peuvent être facilement utilisés en très haut débit et permettent de calculer l'affinité ligand-récepteur. Cependant, cette valeur n'étant pas

prédictive du potentiel activateur du ligand, ces méthodes ne permettent pas de différencier les agonistes des antagonistes et souffrent d'une mauvaise corrélation avec les tests basés sur cellules. Parmi ces techniques, on trouve la co-immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) et les méthodes utilisant des lignées recombinantes.

Le système double-hybride dans des cellules de mammifère permet de détecter les interactions protéine-protéine. Ces cellules possèdent deux transgènes codant pour des protéines de fusion. Le premier hybride est constitué d'une protéine d'intérêt comme le récepteur PXR couplé à une protéine d'activation transcriptionnelle comme VP16 (Herpes simplex virion protéine 16). Le second hybride est constitué du DBD (DNA-binding domain) de la protéine GAL4 issue de la levure, couplée à un fragment du co-activateur tel que SRC-1 (Steroid Receptor Co-activator-1), pouvant interagir avec le RN d'intérêt lors de la fixation d'un ligand. Quant au gène rapporteur, il est sous le contrôle d'une séquence (GAL4UAS) capable d'être reconnue par GAL4 (figure 12). La fixation d'un ligand sur PXR (1) permet l'association avec la protéine de fusion SRC1-GAL4 (2) ainsi que la fixation du complexe sur la séquence promotrice GAL4-UAS (3). La proximité créée entre la TATA BOX et VP16 permet alors le recrutement de la machinerie transcriptionnelle et donc la transcription du gène rapporteur (4). Il existe un risque de faux positif associé à cette technique pouvant résulter d'une interaction artéfactuelle des gènes. (Raucy et al., 2013). En l'absence de ligand, le système double-hybride ne doit pas activer le gène rapporteur car aucune interaction ne doit avoir lieu entre SRC-1 et PXR.

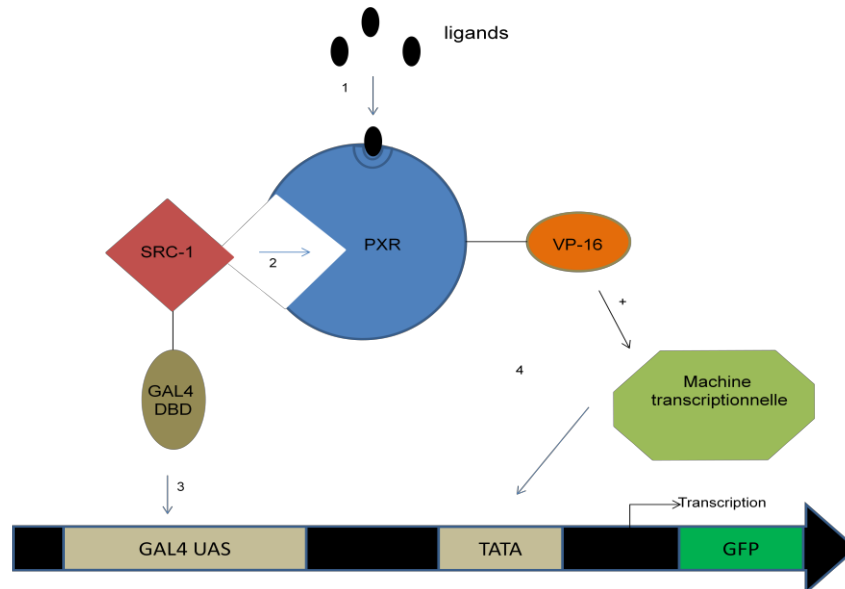


Figure 12 : Système double-hybride de screening des activateurs de récepteurs nucléaires. Le test dit de « transactivation », est une technique utilisant également un gène rapporteur sous le contrôle d'une séquence promotrice qui contient les éléments de réponse spécifique du récepteur d'intérêt, co-exprimé grâce à un second transgène. L'expression transitoire au sein de lignées tumorales humaines est la méthode la plus fréquemment utilisée et présente une bonne corrélation avec les données obtenues sur le CYP3A4 sur culture primaire d'hépatocytes humains (Fahmi et al., 2012; Luo et al., 2002). Même si l'utilisation de lignées stables permet de s'affranchir des limites de l'expression transitoire (efficacité de transfection variable, coût en temps) elle partage les inconvénients inhérents à la lignée tumorale utilisée. En effet, toutes les lignées utilisées jusqu'alors pour développer ce type d'outils sont soit d'origine animale, exposant au biais de variabilités inter-espèces des RN et de leurs co-récepteurs, soit d'origine humaine. Quand elles sont d'origine humaine, elles dérivent du modèle HepG2 qui est dénué de capacité d'activation métabolique empêchant la détection d'une activation secondaire causée par le métabolite. De plus, la translocation du RN dans le noyau peut être constitutive au sein de certaines lignées immortalisées comme cela a été observé pour CAR dans l'étude de Sueyoshi et al. (1999). Dérivée de cellules HepG2, la lignée recombinante utilisée exprimait de manière stable ce récepteur et possédait une expression basale très élevée du gène d'intérêt la rendant insensible à l'induction. Malgré ces limites, ce test n'en reste pas moins largement utilisé en développement pharmaceutique.

e. Approche *in silico* basée sur la relation structure-activité (SAR)

Dès 1868, Crum-Brown et Fraser ont émis l'idée qu'il existait un lien entre la structure chimique d'une molécule et son activité. Plus tard, dans les années 1950, Miller et al. ont remarqué, en testant un panel de substances de structures variées sur des rongeurs, l'apparition de tumeurs. Ils ont émis l'hypothèse qu'une activation métabolique était responsable de la formation de métabolites électrophiles délétères pour l'ADN. Ils ont nommé cela « la théorie électrophile de la carcinogénèse chimique ». Celle-ci a permis à Ashby (1985) d'établir la première liste de structures moléculaires et de groupes fonctionnels associés à un risque carcinogénique. Elle fut une des bases de la génotoxicité prédictive.

L'approche SAR est utilisée depuis plusieurs décennies en développement pharmaceutique et chimique pour optimiser la formule des molécules chefs de file (activité biologique, génotoxicité, etc.). Cependant, son utilisation pour l'identification des carcinogènes non-génotoxiques est plus délicate en raison de la variabilité des mécanismes impliqués et de la difficulté d'en établir une règle commune (Benigni et al., 2008). Des travaux se sont intéressés au potentiel des HAP à inhiber la communication des jonctions GAP et ont permis de déterminer le type de structure impliquée. Il semblerait que seuls les HAP de petite taille basés sur les structures du benzène, du naphthalène ou du fluorène et possédant une région « baie », soient capables d'inhiber les jonctions GAP (Bláha et al., 2002; Upham et al., 1998; Weis et al., 1998) (cf. chapitre contaminants environnementaux).

Paradoxalement, la génération de nouvelles données *in vivo* apporterait des bases supplémentaires et permettrait de développer ces modèles, ce qui constitue en soi la principale limite de cette approche.

Malgré cela, l'utilisation d'outils *in silico* basés sur la relation structure-activité parfois associés à d'autres approches (read-across, catégorisation chimique) continue de se développer largement et pourrait s'inscrire prochainement dans le cadre réglementaire.

f. La toxicogénomique

La transcriptomique est la technique la plus représentée en toxicologie (Goetz et al., 2011; Currie, 2012). Par analogie aux systèmes rapporteurs évoqués précédemment, la toxicogénomique est basée sur le concept que tout effet toxicologique est la conséquence d'une modification quantitative et qualitative des ARNm. L'objectif est d'identifier des

groupes de gènes modulés en fonction du mode d'action carcinogénique. La détection des génotoxiques peut se faire sans difficulté mais ce n'est pas le cas des carcinogènes non-génotoxiques.

Les données publiées basées sur des modèles *in vivo* et *in vitro* ont permis, malgré une variabilité en transcriptome importante, d'identifier des groupes de gènes qui sont préférentiellement modulés en fonction du mécanisme de toxicité. Par exemple, la voie p53 est quasi systématiquement activée par les génotoxiques, *in vitro* et *in vivo*. À l'inverse, les carcinogènes non-génotoxiques induiront plus fréquemment les voies de réponse au stress oxydatif et de contrôle du cycle cellulaire (Doktorova et al., 2013). Cependant, la variabilité et la multiplicité des mécanismes carcinogéniques pouvant être impliqués pour une molécule donnée ne permettent pas pour le moment d'établir des règles strictes.

En raison du caractère dynamique du transcriptome, plusieurs axes d'amélioration ont été proposés, notamment dans le choix des lignées cellulaires qui doit être basé sur leur capacité à exprimer les EMXs et les différents récepteurs, mais également sur leur capacité à maintenir la réponse transcriptionnelle dans le temps. C'est dans ce contexte que Savary et al ont conduit une étude transcriptomique en utilisant des agonistes de PPAR en traitements chroniques sur le modèle HepaRG, leurs résultats ont de nouveau démontré la stabilité du modèle et mis en évidence que de nombreux gènes modulés interviennent dans le métabolisme des lipides et des xénobiotiques.

Schaap et al. (2014) recommandent l'utilisation simultanée de plusieurs types cellulaires. Les critères de choix dans la durée des traitements et le choix des doses doivent être également précisés. A priori, l'utilisation de doses fortes pendant un temps court devrait être favorisée afin d'obtenir une modulation maximale en amplitude et en nombre de gènes, et éviter la prise en compte de réponses secondaires (Zhang et al., 2014).

Ainsi, les méthodes « OMICs », qu'elles soient basées sur des modèles *in vitro* ou *in vivo*, peuvent satisfaire à la règle des 3R. Cependant, il reste encore de nombreux développements à réaliser afin d'améliorer la fiabilité de ces méthodes. L'utilisation de techniques d'analyse couplées entre les différentes méthodes « OMICs » devrait constituer un des principaux axes de recherche.

4. Les contaminants environnementaux

Les contaminants environnementaux représentent un réel problème de santé publique. Même s'ils peuvent être d'origine naturelle (métaux lourds, dioxine, toxines etc.), la plupart d'entre eux sont d'origine anthropiques et sont présents dans l'eau, l'air et l'alimentation. Ce chapitre a pour objectif de présenter brièvement le panel de 10 molécules sélectionnées pour nos travaux. Parmi elles, des hydrocarbures aromatiques polycycliques, des pesticides, des perturbateurs endocriniens, une mycotoxine et un agent alkylant.

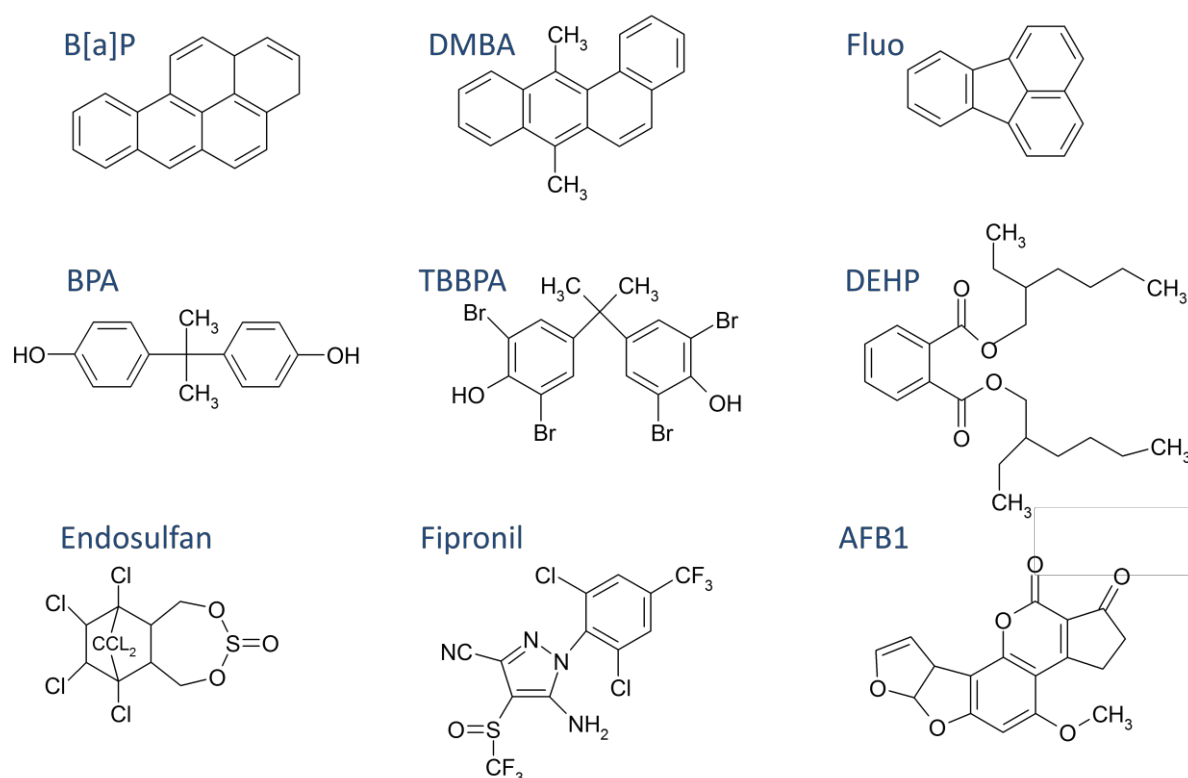


Figure 13 Formules développées des contaminants environnementaux utilisés dans notre étude. B[a]P, benzo[a]pyrène ; DMBA, 7,12-diméthylbenz[a]anthracène ; Fluo, fluoranthène ; BPA, bisphénol A ; DEHP, diéthylhexylphthlate ; TBBPA, tetrabromo-bisphénol A ; AFB1, aflatoxine B1.

4.1. L'aflatoxine b1 (AFB1)

Cette mycotoxine est un hépatogénotoxique indirect nécessitant une activation métabolique essentiellement réalisée par le CYP3A4. L'effet génotoxique de l'AFB1 est bien caractérisé, cette molécule a donc été utilisée comme contrôle positif dans nos travaux.

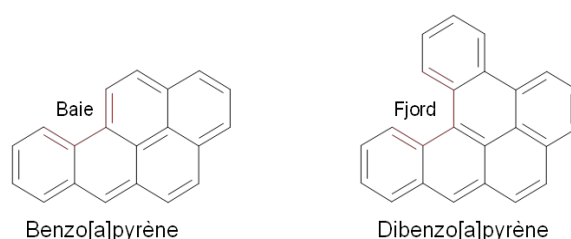
(c.f chapitre 1.1.9.c)

4.2. Le méthyle méthane sulfonate

Chez l'animal, il est établi que ce composé est un carcinogène puissant. Le méthyle méthane sulfonate (MMS) est directement responsable d'une méthylation de l'ADN principalement sur la N7-desoxyguanosine et la N3-desoxyguanosine. Ce type de lésion peut conduire à des cassures double brin et au blocage des fourches de réplication. Il a été utilisé dans nos travaux comme génotoxique direct.

4.3. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les HAP sont des contaminants environnementaux persistants principalement générés lors de la combustion de substances organiques (pyrolitiques). Ils sont présents en quantité significative et sous forme particulaire dans les gaz d'échappement, la fumée de cigarette et les aliments carbonisés. Certaines de ces molécules ont des propriétés immunosuppressives et carcinogènes. Pour exercer leur potentiel toxique, ces molécules requièrent une activation métabolique par les CYPs dont elles sont souvent inductrices grâce à leurs affinités avec le récepteur AhR. Ces différentes propriétés sont partiellement conditionnées par leur structure moléculaire particulière comme les régions de type « baie » et « fjord ». Les CYP1A1 et 1B1 sont les deux cytochromes majoritaires impliqués dans l'activation des HAP (Shimada et al., 2003).



4.3.1. Le benzo[a]pyrène

Le B[a]P est un carcinogène puissant et essentiellement retrouvé à l'état particulaire dans l'atmosphère. Ce HAP est un inducteur puissant des gènes cibles d'AhR tels que les *CYP1A1/2* qui sont responsables de l'activation métabolique et qui aboutissent à la formation successive de deux époxydes réactifs vis-à-vis de l'ADN (figure 13). Le B[a]P-7,8-

époxyde est rapidement hydrolysé et sa réactivité vis-à-vis de l'ADN est mineure en comparaison du B[a]P-7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde.

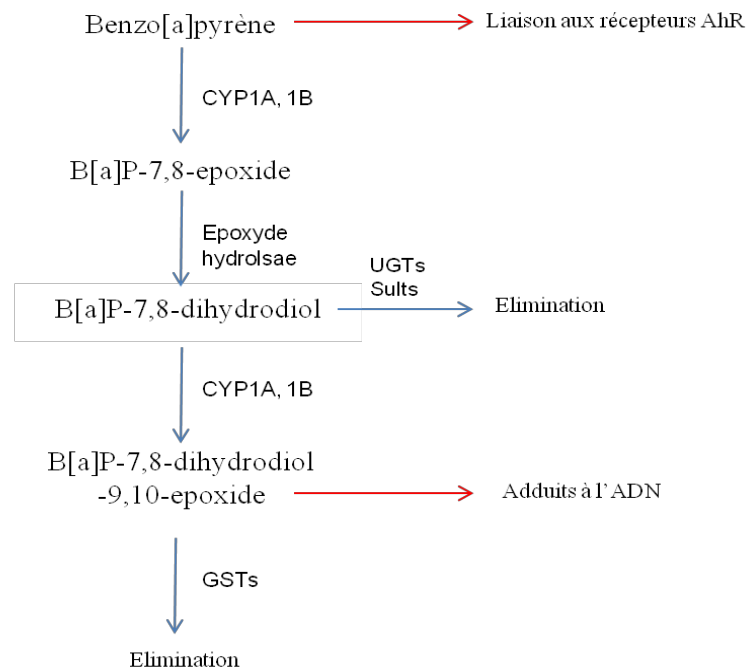


Figure 14 : Métabolisme du Benzo[a]pyrène

4.3.2. Le fluoranthène

Le fluoranthène est 50 fois plus représenté que le B[a]P dans la fumée des moteurs diesels et l'exposition humaine est estimée à environ 1 µg par personne et par jour contre seulement 0,25 µg pour le B[a]P (Dennis et al. 1983). Ce HAP principalement d'origine pyrolytique est également présent dans le goudron de houille utilisé pour assurer l'étanchéité des canalisations d'eau potable.

En comparaison au B[a]P, sa carcinogénicité et sa mutagénicité sont moindres (Chramostová et al., 2004; Durant et al., 1996; Busby et al., 1984) et ce composé n'est pas activateur d'AhR. Les tests de tumorigénicité réalisés sur 24 semaines chez la souris ont montré qu'une dose douze fois supérieure au B[a]P était nécessaire pour induire la tumorigénèse (Busby et al., 1984). Par ailleurs, le test du micronoyau réalisé sur érythrocytes de moelle osseuse de souris et le test H2AX réalisé sur le modèle HepG2 avec ce composé sont négatifs (Stocker et al., 1996; Audebert et al., 2012).

4.3.3. Le 7,12-diméthylbenz[a]anthracène (DMBA)

Le DMBA est un puissant mutagène fréquemment utilisé en association avec l'huile de croton dans des modèles de carcinogénèse cutanée chez le rongeur. Ses effets toxiques sont essentiellement attribués à son métabolite réactif, le DMBA-3,4-dihydrodiol-1,2-époxyde, produit par le CYP1B1 et le CYP1A1. Le CYP1B1 étant présent dans de nombreux tissus extra-hépatiques tels que la moelle osseuse, il joue un rôle prépondérant dans l'immunotoxicité du DMBA (Heidel et al., 1998).

4.4. Les pesticides

4.4.1. L'endosulfan

L'endosulfan est un insecticide et acaricide utilisé sur les cultures légumières, les arbres fruitiers, les cultures céréalières, le coton, le thé ou encore le tabac. Sous sa forme commerciale, l'endosulfan est un mélange stéréoisomérique contenant 70 % de l'isoforme α et 30 % de l'isoforme β . Ce pesticide et ses produits de dégradation peuvent persister jusqu'à 6 mois dans l'environnement (Jayashree et al., 2007). Il est métabolisé par le CYP3A4 et le CYP2B6 pour former l'endosulfan-sulfate, en partie responsable de la toxicité de ce composé. Il est également considéré comme un perturbateur œstrogénique (Casabar et al. 2006; Wozniak et al., 2005; Saiyed et al. 2003). En effet, au travers des récepteurs aux œstrogènes sur lesquels il peut se fixer, l'endosulfan peut être responsable d'un retard de puberté chez les individus masculins.

L'endosulfan est un inducteur transcriptionnel des CYP3A et 2B dans le modèle HepG2 et HepaRG (Casabar et al., 2010; Savary et al., 2014). Malgré de légères différences en termes de génotoxicité observées par Lu et al. (2000) entre les deux isomères, l'endosulfan ainsi que ses métabolites sont mutagènes chez la bactérie. Dans les lymphocytes humains, les cellules CHO et HepG2, l'endosulfan et ses produits de dégradation sont également positifs au test des comètes (Lu et al., 2000; Jamil et al., 2004; Sobti et al., 1983). Ainsi, si une activation métabolique peut potentialiser l'effet génotoxique au travers des métabolites produits, l'endosulfan seul et sous forme native peut exercer un effet délétère sur l'ADN comme cela a été observé sur les cellules CHO n'exprimant pas de CYPs (Lu et al., 2000; Bajpayee et al., 2006).

4.4.2. Le fipronil

Le fipronil est un produit phytosanitaire et vétérinaire largement utilisé. Cette molécule est rapidement métabolisée en fipronil-sulfone par le CYP3A4 et marginalement par le CYP2C19 (Das et al., 2006) avant d'être conjuguée (Cravedi et al. 2013) sous forme de sulfate et de glucuronide. Chez le rat, le fipronil-sulfone possède une demi-vie plasmatique longue et est associé à une élévation de la TSH circulante (Thyroid stimulating hormone) et à une incidence élevée de tumeurs thyroïdiennes (rapport AFSSA: Arnich et al., 2005). Concernant la génotoxicité, ce rapport conclut à l'absence d'effets significatifs de cette molécule. Cependant, Çelik et al. (2014) sur des lymphocytes humains circulants obtiennent des résultats positifs avec le test des comètes et de l'échange de chromatide sœur. *In vivo* chez la souris, des résultats positifs ressortent du test des comètes sur lymphocytes, seulement à des doses élevées (50 mg/kg). Le fipronil est capable d'induire le CYP3A4 et le CYP1A1 dans de fortes proportions, ainsi que le CYP2B6 et le CYP3A5 dans une moindre proportion (Das et al., 2006).

4.5. Les perturbateurs endocriniens

Ces molécules sont des xénobiotiques synthétiques pouvant moduler le système endocrinien et altérer la réponse normale aux hormones comme les œstrogènes. Les perturbateurs œstrogéniques se retrouvent dans de nombreux produits plastifiés, retardateurs de flamme et pesticides. La similarité structurelle de ces molécules avec les œstrogènes leur confère la capacité de se lier aux récepteurs œstrogéniques. Dès lors, elles peuvent altérer de nombreux processus physiologiques et en particulier le déroulement normal de la puberté.

4.5.1. Le diéthylhexylphthalate (DEHP)

Le DEHP fait partie des phtalates de hauts poids moléculaires principalement utilisés dans les matériaux plastiques (contenants alimentaires, chaussures, etc.). Les emballages alimentaires constituent une des principales sources d'exposition humaine. En effet, les phtalates possèdent la propriété de diffuser en dehors du polymère plastique. Après ingestion, le DEHP est en partie métabolisé par les lipases pancréatiques en Mono(2-EthylHexyl)Phthalate (MEHP), qui représente la forme principale absorbée (Huber et al.,

1996). Cependant, une fraction de DEHP est absorbée et transformée par les lipases hépatiques. Par la suite, le MEHP est successivement oxydé par les CYPs puis conjugué par les UGTs et les SULTs avant d'être excrété.

Si seulement certains phtalates ont la capacité de se lier aux récepteurs aux œstrogènes, ce sont tous des proliférateurs de peroxyosomes (Zacharewski et al., 1998; Hurst et al., 2004). Cette capacité de liaison aux PPARs est impliquée dans le pouvoir hépatocarcinogène du DEHP démontré chez le rongeur (Kaufmann et al., 2002).

Si certaines études rapportent une absence de génotoxicité (Astill et al., 1986; Elliott et al., 1987; Müller-Tegethoff et al., 1995), la plupart et notamment celles basées sur le test des comètes rapportent une génotoxicité significative du DEHP (Erkekoglu et al., 2010; Anderson et al., 1999). Cette génotoxicité semble être principalement due au stress oxydatif causé par la prolifération des peroxyosomes (Erkekoglu et al., 2014).

4.5.2. Le tetrabromo-bisphénol A (TBBPA)

Le TBBPA est un retardateur de flamme bromé. Ce composé est largement utilisé lors de la conception de matériaux résistants au feu. Chez l'Homme, ce composé qui est absorbé par le tractus gastro-intestinal, est rapidement métabolisé sous forme de glucuronide et de sulfate (Schauer et al., 2006). Son potentiel de perturbateur endocrinien réside dans sa capacité à se fixer sur le transthyrétine, la protéine de transport de la thyroxine (T4). Cette fixation conduit à diminution de la T4 circulante (Meerts et al., 2000). Les travaux de Kitamura et al. (2005) rapportent également une capacité anti-œstrogénique.

Chez le rat, le TBBPA est capable d'induire le CYP2B1 au travers du récepteur CAR. Ce CYP induit par une exposition chronique est responsable de la production d'EROs induisant la formation de 8-OHdG. Cependant, le foie semble être épargné par cette élévation du taux de bases oxydées, seuls les reins et les testicules sont atteints (Choi et al., 2011). De plus, le fait que le TBBPA augmente la libération de cytokines pro-inflammatoires et induise la COX-2 (Cyclooxygénase 2) dans les macrophages murins, doit également contribuer au stress oxydatif causé par cette molécule (Han et al., 2009).

4.5.3. Le bisphénol A

Le bisphénol A (2,2-bis-(4-hydroxyphenyl)propane ; BPA) est essentiellement utilisé dans l'industrie plastique où il entre dans la composition de nombreux objets courants tels que les contenants alimentaires, les jouets ou encore les tubulures pour perfusion. De par son omniprésence, l'exposition humaine est importante comme l'atteste la présence de ce composé au sein d'échantillons humains (Vandenberg et al., 2007) .

Le BPA est un perturbateur endocrinien. Son potentiel s'exerce au travers de divers mécanismes. En effet, s'il possède une affinité relativement faible envers les récepteurs aux œstrogènes, il semble être capable de moduler la stéroïdogénèse (Zhang et al. 2005; Hilscherova et al. 2004).

En terme de génotoxicité, le BPA ressort positif dans plusieurs études. Ulutaş et al. (2011) obtiennent une réponse positive au test des comètes *in vivo* chez le rat. Audebert et al. (2011) obtiennent des résultats positifs sur des cellules ACHN (lignée de cellules reinales) avec le test H2AX à partir de 10 µM. Ils montrent que ce modèle est dépourvu d'activité métabolique vis-à-vis du BPA. En revanche, au sein de modèles capables de biotransformation (HepG2 et LS174T), le BPA ressort négatif sur le test H2AX.

Avec le docteur Marie-Anne Robin, nous avons souhaité détailler dans une revue les mécanismes et les différentes EMXs modulées par le BPA. Cette revue vous est présentée ci-après.

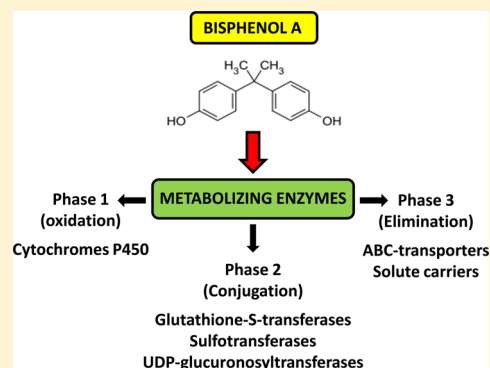
Modulation of Metabolizing Enzymes by Bisphenol A in Human and Animal Models

Nicolas Quesnot, Simon Bucher, Bernard Fromenty,* and Marie-Anne Robin

INSERM, UMR 991, F-35033 Rennes, France

University of Rennes 1, F-35043 Rennes, France

ABSTRACT: Xenobiotics, such as contaminants and drugs, can be converted to potentially toxic reactive metabolites by phase 1 oxidizing enzymes. These metabolites are further detoxified by phase 2 conjugating enzymes and eliminated from cells by phase 3 transporters. Moreover, many of these xenobiotics are also able to induce or inhibit these enzymes, potentially modulating their own toxicity or that of other chemicals. The present review is focused on bisphenol A, a synthetic monomer used for many industrial applications and exhibiting xenoestrogen properties. The impact of this contaminant on all major classes of metabolizing enzymes (i.e., cytochromes P450, glutathione-S-transferases, sulfotransferases, UDP-glucuronosyltransferases, and transporters) was reviewed, with a highlight on the modulation of cytochromes P450 involved in steroid metabolism. Interestingly, most of the studies reported in this review show that BPA is able to induce or inhibit metabolizing enzymes at high doses but also at doses compatible with human exposure.



CONTENTS

Introduction	1463
Effects on Cytochromes P450	1465
CYPs Metabolizing Xenobiotics	1465
CYP1A Subfamily	1465
CYP2B Subfamily	1466
CYP2C Subfamily	1466
CYP3A Subfamily	1466
Other Xenobiotic-Metabolizing CYPs	1467
CYPs Metabolizing Endogenous Steroids	1467
<i>In Vivo</i> Studies	1467
<i>In Vitro</i> Studies	1468
Effects on Glutathione-S-transferases	1468
Effects on Sulfotransferases	1469
Effects on UDP-Glucuronosyltransferases	1470
Effects on Transporters	1470
Conclusions	1470
Author Information	1471
Corresponding Author	1471
Funding	1471
Notes	1471
Abbreviations	1471
References	1471

INTRODUCTION

Xenobiotics can exert their toxicity on target organs either directly or after bioactivation by metabolizing enzymes. Many contaminants are themselves able to induce or inhibit these enzymes and could thereby increase their own toxicity or the

toxicity of compounds requiring metabolic activation. Metabolizing enzymes are divided into 3 major categories commonly referred to as phase 1, phase 2, and phase 3 enzymes. These enzymes are, respectively, involved in oxidation, conjugation, and transport reactions.

Bisphenol A (BPA) is a synthetic monomer used in the production of polycarbonate plastics and epoxy resins and to make thermal paper. BPA-based plastic is used in a variety of common consumer goods, such as water bottles, sport equipment, CDs, and DVDs. Epoxy resins containing BPA are used to coat the inside of many food and beverage cans. BPA is also known as an environmental estrogen and is one of the highest-volume chemicals produced worldwide. Metabolism of BPA is mainly driven by phase 2 conjugation enzymes in the liver and the gastrointestinal tract. In humans and rats, the most abundant metabolite is the monoglucuronide conjugate which can represent more than 90% of all BPA metabolites.^{1–3} Glucurono-conjugation represents a major detoxification pathway as BPA glucuronide, unlike free BPA, does not bind to estrogen receptors.⁴ Among a panel of human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) isoforms involved in BPA glucuronidation (UGT1A1, 1A3, 1A9, 2B4, 2B7, and 2B15), UGT2B15 was reported to be the enzyme showing the highest activity toward BPA in an *in vitro* system using human liver microsomes and recombinant UGTs.⁵ In the rat liver, the UGT responsible for the glucuronidation of BPA is UGT2B1, which is homologous to human UGT2B7/B17.⁶ Other minor

Received: March 13, 2014

Published: August 20, 2014

Table 1. Summary of BPA Modulator Effects on Phase 1 CYP Enzymes in Different Organs from Different Species

CYP	species (strain)	tissue	model route ^a exposure ^b	doses/concentrations length and (period) ^c of treatment	change (R, A, P) ^d subtype	ref
CYP1A	mouse (ICR)	cerebra, cerebellum, gonads, liver	<i>in vivo</i> , PO, erinatal	0.2–20 mg/kg/d (J6.5–J17.5 dpc)	↑ (R, P)	16
		liver	Hepal1c7 cells	10/50 μM for 18 h	↓ (R, A)	21
	rat (Wistar)	liver	<i>in vivo</i> , IP microsomes	20/40 mg/kg/d for 4 d 100 μM	= (A, P) ↓ (A)	17 22, 29
CYP2A	field vole	liver	<i>in vivo</i> , SC	10/50/250 mg/kg/d for 4 d	↓ (A)	20
	rat (Wistar)	liver	<i>in vivo</i> , IP microsomes	20/40 mg/kg/d for 4 d 100 μM	= (A) ↓ (A)	17 22
CYP2B	rat (Wistar)	liver	<i>in vivo</i> , IP microsomes	20/40 mg/kg/d for 4 d 100 μM	= (A, P) ↓ (A)	17 22
CYP2C	human	liver	microsomes	100 μM/1 mM	↓ (A)	28, 29
	rat (Wistar)	liver	<i>in vivo</i> , IP microsomes	20/40 mg/kg/d for 4 d 100 μM	↓ (A, P) ↓ (A)	17 22, 24
CYP2D	rat (Wistar)	liver	<i>in vivo</i> , IP microsomes	20/40 mg/kg/d for 4 d 100 μM	= (A) ↓ (A)	17 22
CYP2E	rat (Wistar)	liver	<i>in vivo</i> , IP microsomes	20/40 mg/kg/d for 4 d 100 μM	= (A, P) ↓ (A)	17 22
CYP3A	rat (Wistar)	liver	<i>in vivo</i> , IP microsomes	40 mg/kg/d for 4 d 0.3 mg/kg for 24 h	↓ (A, P) ↑ (R)	17 34
			FAO cells	1–50 μM for 24 h	= (R)	36
			microsomes	100 μM	↓ (A)	22
	monkey	kidney	COS-7 cells	10 pM–10 μM for 36 h	= (R)	34
CYP4A	human	liver	HepG2 cells	10 μM for 24 h	↑ (R)	35
			DPX2 cells	1–50 μM for 24 h	↑ (R, A)	36
	rat (Wistar)	liver	<i>in vivo</i> , IP microsomes	20/40 mg/kg/d for 4 d 100 μM	↑ (A, P) = (A)	17 22
CYP11A1	human	liver	microsomes	100 μM	↑ (A)	29
	mouse (C57BL/6)	urogenital sinus, heart, cerebellum, kidney, ovary	<i>in vivo</i> , PO, perinatal	20 μg/kg/d (embryonic d 13 to 16)	↑ (R)	45
	rat (Sprague–Dawley)	ovary	<i>in vivo</i> , PO, chronic theca interstitial and granulosa primary cells	1 or 100 μg/kg/d for 90 d 0.1–10 μM for 72 h	= (P) ↑ (R)	46 53
CYP17A1	fish (rare minnow)	ovary, testis	<i>in vivo</i> , water	10/100 μg/mL for 4 d 5–50 μg/L for 7 d	↓ (R) ↑ (R)	54 48
	human	testis	microsomes	10–100 μM	↓ (A)	50
CYP19A1	rat (Sprague–Dawley)	testis	microsomes	10–100 μM	↓ (A)	50
	(Long-Evans)		Leydig primary cells	0.01 nM for 18 h	↓ (R)	51
	(Sprague–Dawley)	ovary	theca interstitial primary cells	0.1–100 μM for 72 h	↑ (R)	53
	fish (rare minnow)	ovary	<i>in vivo</i> , water	5–50 μg/L for 7 d	↑ (R)	48
CYP19A1	rat (Wistar)	prostate	<i>in vivo</i> , SC	25–600 μg/kg/d for 4 d	↑ (R, P)	42
	(Long–Evans)	testis	Leydig primary cells	0.01 nM for 18 h	↓ (R)	51
			Leydig R2 cells	0.1–10 nM for 3 d	↑ (R, P, A)	52
	(Wistar)	prefrontal cortex	<i>in vivo</i> , SC	50 μg/kg/d for 4 d	↑ (R, P)	41
	(Sprague–Dawley)	ovary	<i>in vivo</i> , PO, chronic theca interstitial primary cells	1 or 100 μg/kg/d for 90 d 1–100 μM for 72 h	↓ (P) ↓ (R)	46 53
	human	ovary	granulosa-like cell line (KGN)	5–100 μM for 24 h 40–100 μM for 48 h	↓ (R, A) ↓ (R)	55 56
		placenta	JEG cell line, PL30 cells	5–100 μM for 24 h	↓ (R, A)	57
	mouse (C57BL/6)	urogenital sinus, heart, cerebellum, kidney, ovary	<i>in vivo</i> , PO, perinatal	20 μg/kg/d (embryonic d 13 to 16)	↑ (R, A)	45
	fish (rare minnow)	whole juveniles	<i>in vivo</i> , water	10 nM for 3 d 0.1–10 nM for 3 d	↓ (R) 19a1a ↓ (R) 19a1b	47
	(rare minnow)	ovary	<i>in vivo</i> , water	5–50 μg/L for 7 d	↑ (R) 19a1a	48
	(zebra-fish)	whole embryo	<i>in vivo</i> , water	10 nM –10 μM for 48 h after fertilization	= (R) 19a1a ↑ (R) 19a1b	49

Table 1. continued

^aRoute of exposure (PO, per os; SC, subcutaneously; IP, intraperitoneally). ^bWhen not specified, the mode of exposure is acute or repeated for few days in adults. ^cThe period of treatment is indicated when the exposure is perinatal. ^dChanges in mRNA (R), protein (P) expression, or activity (A) are indicated in parentheses, followed by subtype for CYP19a1.

metabolites have been observed such as sulfate conjugates, glucuronide/sulfate diconjugates and conjugated methoxylated or hydroxylated compounds.^{2,7,8} Indeed, BPA can undergo metabolic activation in the presence of microsomes, the major source of phase 1 oxidative enzymes including cytochromes P450 (CYPs).^{9,10}

Over the past decade, substantial evidence shows developmental and reproductive toxicity of BPA in laboratory animals, including adverse effects on fertility and reproduction but also germ cell damage and persistent changes to breast and prostate tissue in the offspring of exposed animals.¹¹ More recently, given the increased incidence of metabolic disorders such as obesity and type 2 diabetes, BPA has been suspected to have obesogenic and diabetogenic effects.¹² Considering the endocrine properties of BPA, it is essential to identify its effects on enzymes implicated in hormone biosynthesis, such as CYP17 and CYP19 families. As the worldwide population is exposed to BPA, it is also important to know how it regulates the whole set of xenobiotic metabolizing enzymes to better understand interactions between BPA and drugs or other contaminants.

In the present review, the various effects of BPA on the major metabolizing enzymes, i.e., CYPs, glutathione-S-transferases (GSTs), sulfotransferases (SULTs), UGTs, and transporters are depicted, with a focus on CYP19, which is involved in the biotransformation of testosterone and androstenedione to estradiol and estrone, respectively. The cited studies were performed *in vitro* in diverse cell models from various origins or *in vivo* on animal models. To better understand the notion of the high and low doses reported in this review, it is important to stress that the no adverse effect level (NOAEL) for BPA is currently 5 mg/kg per day and that the tolerable daily intake (TDI) was fixed by both the U.S. Environmental Protection Agency and the European Food Safety Agency (EFSA) at 0.05 mg/kg per day. The NOAEL is derived from animal studies conducted according to regulatory guidelines, and the TDI is typically a 100-fold less than the NOAEL. However, for several years, there has been considerable debate regarding the doses of BPA leading to toxic events, and EFSA is currently reevaluating BPA. Many studies performed in rodents alleged that BPA induces adverse effects at doses far below the TDI, compatible with the range of human exposure, and exhibits nonmonotonic dose responses.^{13,14} Indeed, BPA has been searched in different human fluids. A review by Vandenberg et al. examined more than 80 published human biomonitoring studies and showed that BPA concentrations differ across fluids and populations. For urine and blood, they comprised roughly between 0.1 and 10 ng/mL.¹⁵

■ EFFECTS ON CYTOCHROMES P450

The CYP superfamily represents the major class of phase 1 metabolizing enzymes. They catalyze numerous oxidation reactions such as hydroxylations, S- or N-oxidations, and N- and O-dealkylations. They are implicated in the biotransformation of exogenous (drugs, toxics, pollutants, etc.) as well as endogenous compounds (hormones, vitamins, lipids, etc.). CYPs are organized into families and subfamilies, respectively,

designated by an arabic numeral (e.g., CYP1) and a letter (e.g., CYP1A), depending on their amino acid sequence homology. Isoforms are defined by another number (e.g., CYP1A1). In humans and animals, xenobiotic biotransformation reactions are mostly completed by CYP1 to 3 families. Members of the CYP4 family are specialized in the ω -hydroxylation of endogenous saturated and unsaturated fatty acids as well as prostaglandins but can also metabolize drugs. Other CYP families such as CYP11, CYP17, or CYP19 families are implicated in endogenous biotransformation, in particular regarding steroid and vitamin synthesis. The oxidative capacity of CYPs is essential in terms of xenobiotic detoxification, but it can also be deleterious when CYPs are involved in the activation of procarcinogens to carcinogens or drugs to reactive metabolites. As previously mentioned, their expression can be modulated by a lot of xenobiotics. Thus, BPA could modify the action of a drug or impact the synthesis of a particular hormone if it modulates a particular CYP implicated in these processes. This section will be divided into two parts dealing with the effects of BPA on CYPs metabolizing xenobiotics and endogenous steroids, respectively. These effects are summarized in Table 1.

CYPs Metabolizing Xenobiotics. CYP1A Subfamily.

There are only two members in this subfamily that share the same nomenclature (CYP1A1 and 1A2) in different species including rodents and humans. Both isoforms detoxify or activate numerous environmental procarcinogens, toxins, and several drugs. The CYP1A activity is induced by polycyclic aromatic hydrocarbons, such as those found in the products of industrial compound incineration, cigarette smoke, grilled meat, and some cruciferous plants. CYP1A1 is mostly extrahepatic and is highly inducible in many tissues, whereas CYP1A2 is essentially expressed in the liver. Both enzymes are under the regulation of the aryl hydrocarbon receptor (AhR), a member of the Per-Arnt-Sim family of transcription factors.

In Vivo Studies. Nishizawa et al. reported that *in utero* exposure to BPA disrupted the expression of AhR and CYP1A1 in murine embryos.¹⁶ In this study, pregnant ICR mice were orally administered BPA (0.02, 2, 200, or 20,000 μ g/kg per day) from 6.5 to 13.5 (mid-developmental stage) and 6.5 to 17.5 (late-developmental stage) days *postcoitum* (dpc) and sacrificed 24 h after the last administration of BPA. All doses of BPA induced AhR mRNA expression in the cerebra, the cerebella, and gonads of mid- and late-stage embryos. CYP1A1 mRNA expression was induced only in the cerebra and the cerebella of late-stage embryos at the two highest doses. Liver CYP1A1 mRNA expression was not measured in this study, but hepatic CYP1A1 protein levels were slightly increased with these two high doses.¹⁶

Conversely, other studies performed with adult animals showed no effect or a decrease in CYP1A protein levels or activities in the liver. Indeed, in male Wistar rats intraperitoneally treated with high doses of BPA (20, 40 mg/kg per day for 4 days), Hanioka et al. found no change in CYP1A1/2 protein levels or in CYP1A-dependent activities of 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD), 7-methoxyresorufin O-demethylase, and 7-ethoxycoumarin O-deethylase (ECOD).

A diminution of estradiol 2-hydroxylase (ED2H) activity was observed; however, ED2H may not be specific for CYP1A2.¹⁷ Reports indicate that in humans, rats, or hamsters, ED2H activity in the liver or kidney is catalyzed by both CYP1A and 3A subfamilies.^{18,19} EROD activity was also found to be decreased in field voles (*Microtus agrestis*) subcutaneously treated for 4 days with 10, 50, and 250 mg/kg BPA per day.²⁰

In Vitro Studies. In mouse Hepa-1c1c7 hepatoma cells treated with 10 and 50 μM of BPA for 18 h, Jeong et al. showed a down-regulation of mouse Cyp1a1 mRNA as well as a concentration-dependent inhibition of EROD activity. However, this was observed only when cells were coincubated with dioxine, a prototypic inducer of CYP1A1.²¹

In another study, Hanioka et al. directly incubated BPA (100 μM) with control rat liver microsomes and found a mixed inhibition of ECOD ($K_i = 71.9 \mu\text{M}$) and acetanilide 4-hydroxylase (AA4H, $K_i = 66.8 \mu\text{M}$).²² Again, the specificity of these enzymes can be discussed. Indeed, ECOD activity is catalyzed by a number of CYPs (CYP1A1/2, 2A6, 2B6, 2C9, 2E1, and 3A4/5 in humans and CYP1A1/2, 2B1/2, and 2E1 in rats, for example),²³ while AAH4 seems to be more specific for CYP1A.

CYP2B Subfamily. In humans, the CYP2B subfamily consists of one member, CYP2B6, and in rats in two very close isoforms, CYP2B1 and 2B2. CYP2B are mainly implicated in drug liver metabolism and regulated by the constitutive androstane receptor (CAR, NR1I3) and the pregnane X receptor (PXR, NR1I2), two orphan nuclear receptors. Phenobarbital is the prototypical inducer of the CYP2B subfamily in most mammalian species via CAR activation. Only few studies have reported the effects of BPA on CYP2B expression.

In their *in vivo* study, Hanioka et al. showed no change in CYP2B1/2-dependent 7-benlyoxyresorufin *O*-debenzylase activity or in the liver protein content of rats intraperitoneally treated with 20 or 40 mg/kg BPA per day for 4 days.¹⁷

However, the same group²² and another one²⁴ showed that BPA strongly inhibits another CYP2B-supported activity, namely, testosterone 16 β -hydroxylase (T16BH) in rat liver microsomes incubated with 100 μM BPA ($K_i = 25.9 \mu\text{M}$). It is noteworthy that CYP2C11 is also involved in 16 β -hydroxy testosterone formation together with CYP2B1/2²⁵ and that thus the T16BH inhibition may be explained by a decreased activity of both CYPs.

CYP2C Subfamily. In humans, the CYP2C subfamily consists of 4 members, namely, CYP2C8, 2C9, 2C18 and 2C19 that represent 20% of liver CYPs and metabolize more than 20% of pharmaceutical drugs.²⁶ Among the nuclear receptors involved in the control of CYP2C transcription, CAR and PXR have been the most studied ones. However, glucocorticoid and vitamin D receptors can also be involved in CYP2C modulation after activation by specific compounds such as dexamethazone or 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃.²⁶

In rats, CYP2C isoforms are the most abundant CYPs in the liver, and several orthologous isoforms are expressed (CYP2C6, 2C7, 2C11, 2C12, and 2C13 and some others of less importance). It is noteworthy that CYP2C11 and 2C12 are, respectively, male and female specific and that most of the studies on the effects of BPA on the expression of CYP2C have been performed in male rats. CYP2C11 is the major constitutive isoform in the liver of male rats representing around 40% of total CYPs.²⁷ The studies identified in this review indicate that BPA strongly inhibits hepatic CYP2C

expression and activity *in vivo* and when incubated with liver microsomes.

In vivo, Hanioka et al., showed that intraperitoneal administration of high doses of BPA (20 and 40 mg/kg per day) to rats decreased CYP2C11/6 protein levels and CYP2C11-dependent testosterone 2 β -hydroxylase activity (T2BH).¹⁷

In human liver microsomes, BPA (1 mM) exhibited a strong noncompetitive-type inhibition (80%) of aminopyrine *N*-demethylase activity with a K_i value of 97 μM .²⁸ This activity is supported by CYP2C8/19 but also by CYP2B6 and 2D6. BPA also showed a mixed-type inhibition of *S*-mephenytoin 4-hydroxylation which is more specific for CYP2C19, with a K_i value of 113 μM .²⁸ Additionally, another study also using microsomes found that among several human CYPs, the CYP2C subfamily was the most inhibited by BPA.²⁹ This inhibitory effect was reproduced in rat liver microsomes^{22,24} and slices²⁴ incubated with BPA (100 and 200 μM , respectively), showing again an extensive inhibition of CYP2C11-dependent testosterone 2 α -hydroxylase²² and T2BH²⁴ activities. The inhibition type of the testosterone 2 α -hydroxylation reaction was mixed with a K_i value of 24.9 μM in the Hanioka et al. study,²² whereas results from the Pfeiffer and Metzler's study²⁴ suggest an irreversible type of inhibition.

CYP3A Subfamily. CYP3A subfamily members represent the most abundant CYPs in the human liver and are involved in the biotransformation of numerous xenobiotics including pollutants and around 50% of therapeutic drugs, as well as endogenous compounds.³⁰ The human CYP3A subfamily contains 3 members, namely, CYP3A4, 3A5, and 3A7, which is only expressed in fetal liver. In rats, CYP3A2 is the main constitutive liver enzyme, while the expression of CYP3A1 is lower. CYP3A expression can be induced or repressed by xenobiotics, mostly via PXR^{31,32} and CAR.³³

In Vivo Studies. In male Wistar rats, two studies exhibit weak or inhibitory effects of BPA on the CYP3A subfamily. Masuyama et al. showed a weak induction of CYP3A1 mRNA expression 24 h after an intraperitoneal injection of 0.3 mg/kg BPA despite the lack of effect on PXR-mediated transcription.³⁴ Hanioka et al. evidenced a significant reduction of CYP3A1/2 protein levels in liver microsomes from rats exposed intraperitoneally to 40 mg/kg per day for 4 days.¹⁷ This diminution was accompanied by a decrease of testosterone 6 β -hydroxylase (T6BH) activity, while erythromycin *N*-demethylase activity was not significantly decreased.¹⁷

In Vitro Studies. At a concentration of 10 μM , BPA was shown to induce the CYP3A4 gene in HepG2 cells transiently cotransfected with human PXR expression plasmid and a CYP3A4 luciferase reporter construct.³⁵ These results were recently confirmed using the same strategy in DPX2 human hepatoma cells. Indeed, BPA (1, 5, 10, and 50 μM) was able to dose-dependently enhance human CYP3A4 mRNA expression and CYP3A4-dependent T6BH activity after 24 h of exposure.³⁶ However, the same concentrations of BPA failed to induce CYP3A1 in FAO rat hepatoma cells cotransfected with rat PXR and CYP3A1, suggesting human specificity in BPA's effects.³⁶ Additionally, BPA did not modify PXR-mediated transcription in COS-7 cells cotransfected with rat PXR and CYP3A1 at any tested concentrations ranging from 10 pM to 10 μM .³⁴ Lastly, incubation of BPA (100 μM) with isolated rat microsomes also showed a strong mixed inhibition of T6BH, with a K_i value of 88.4 μM .²²

These studies suggest that BPA is an inducer of the CYP3A family in humans but not in rodents. Species differences in CYP3A regulation could be explained by the variation in the ligand-binding domain of PXR. Rat and human PXR share only 76% homology in this sequence. As a result, many ligands activate PXR in humans but not in rodents and vice versa.³⁷ For example, several pesticides (chlorpyrifos and endosulfan) or drugs (rifampicin and tamoxifen) are exclusively human PXR agonists, whereas pregnenolone 16 α -carbonitrile (a prototypical CYP3A inducer in mice and rats) and 5 α -dihydrotestosterone or cyproterone acetate (two steroids used in therapeutics) activate rodent PXR but not human PXR.³⁷ Sui et al. showed that BPA and several of its analogues (bisphenol B, bisphenol AF, and 4-cumyl phenol) are potent agonists for human but not rodent PXR. They also identified residues in the ligand-binding domain of human PXR that are involved in the interactions with BPA and its analogues.³⁸

Other Xenobiotic-Metabolizing CYPs. The effects of BPA on other xenobiotic-metabolizing CYP are poorly documented. These other CYPs are mainly members of family 2, which are implicated in drug biotransformation (CYP2D) and/or in procarcinogen activation (CYP2E), and members of family 4, which play a role in fatty acid oxidation.

In vivo, no change in CYP2A1-, 2D1-, and 2E1-dependent activities was reported in rats intraperitoneally treated for 4 days with 20 or 40 mg/kg BPA per day, but CYP4A1/2 protein levels and CYP4A-dependent lauric acid ω -hydroxylation (LAOH) were increased.¹⁷

After incubation of BPA (100 μ M) with rat microsomes, CYP2A1-dependent testosterone 7 α -hydroxylase activity and LAOH exhibited a K_i value >1000 μ M, suggesting that BPA does not interact with CYP2A1 or with CYP4A1/2.²² However, another group showed that BPA (100 μ M) stimulated CYP4A activity in pooled human liver microsomes.²⁹ CYP2A2-, 2D1-, and 2E1-dependent activities (as well as CYP2E1 protein content) were decreased with, respective, K_i values of 71.9, 81.4, and 50.5 μ M.²²

As a summary, several drug-metabolizing CYPs appeared to be unchanged or inhibited by BPA in the human or rodent liver, at one or several levels (mRNA expression, protein level, and/or activity), whatever the model or the dose used. However, a study showed an increase of CYP1A1 at the embryo stage.¹⁶ Several others report a species specificity for the CYP3A subfamily as its members are unaffected or inhibited in animal models^{17,34} but induced in human models.^{34,36} Lastly, the CYP4 family, which metabolizes both endogenous and exogenous substrates, seems to be induced by BPA in the rat and human liver.^{17,29} Considering the low number of studies, these findings have to be taken carefully.

CYPs Metabolizing Endogenous Steroids. Several CYPs play a key role in sex steroid hormone synthesis and particularly CYP11A1 (side-chain cleavage), CYP17A1 (steroid 17- α -monooxygenase), and CYP19A1 (aromatase). CYP11A1 is a rate-limiting enzyme that catalyzes the first step of this process, i.e., the biotransformation of cholesterol to pregnenolone. CYP17A1 further metabolizes pregnenolone to dehydroepiandrosterone, whereas CYP19A1 is responsible for the formation of estrogens (estradiol from testosterone and estrone from androstenedione). Considering the estrogen-mimetic properties of BPA, many groups are interested in studying the impact of BPA exposure on these key enzymes. There are mainly *in vivo* studies on rodents or teleost fishes and *in vitro* studies on gonads cells. Indeed, fishes represent an important target

species due to water contamination. A majority of vertebrates possess a single CYP19A1 isoform, which is expressed in different tissues. Teleost fishes have two CYP19A1 subtypes, namely, *cyp19a1a* and *19a1b*.³⁹ Other CYPs, such as CYP21 or 11B1, are implicated in cortisol and aldosterone biosynthesis, but to our knowledge, no research group has looked at the effects of BPA on these CYPs. This section has been divided into two parts dealing with *in vivo* and *in vitro* studies, respectively.

In Vivo Studies. These studies were performed on male and/or female animals and include a large variety of models (rat, mouse, and fish), protocols of exposure (acute/chronic and perinatal/adult stage), and doses.

Castro et al. injected adult male rats subcutaneously with 25, 50, 300, and 600 μ g/kg⁴⁰ or only with 50 μ g/kg⁴¹ BPA per day for 4 days to study its effects on the prostate and the prefrontal cortex, respectively. Messenger RNA levels of CYP19A1 were increased in the prostate of rats at all doses tested but not in dose-dependent manner. Protein levels were also augmented in rats exposed to 50 μ g/kg BPA per day. As a result, BPA-treated rats exhibited a higher plasma estradiol/testosterone ratio.⁴⁰ It is noteworthy that an augmentation of CYP19A1 and a higher estradiol/testosterone ratio have been described in human prostate diseases.⁴² Behavioral disorders and neurotoxic effects have also been linked to perinatal BPA exposure in animal models.^{43,44} However, little is known regarding the impact of BPA on the adult brain. In their study, Castro et al. showed that BPA exposure (50 μ g/kg BPA per day) for 4 days increased CYP19A1 mRNA expression and protein levels in the prefrontal cortex of male and female rats and identified 17 genes related to prefrontal cortex functions (memory and synaptic plasticity) as potential targets of BPA.⁴¹ Another study showed that pregnant C57BL/6 mouse exposure to BPA (20 μ g/kg per day by oral gavages from embryonic days 13 to 16) caused an increase of CYP19A1 activity and estradiol in the urogenital sinus of male and female mouse fetuses, which were collected between embryonic day 17 and postnatal day 1. Messenger RNA of CYP19A1 and 11A1 were upregulated by BPA in the urogenital sinus and also in the cerebellum, the heart, the kidney, and the ovaries (but not in the testes).⁴⁵

In adult female Sprague–Dawley rats, Lee et al. showed a diminution of CYP19A1 in ovary granulosa cells, and no change of CYP11A1 protein levels in theca interstitial cells.⁴⁶ In this particular study, rats were chronically (90 days) exposed to BPA administered by gavage at the doses of 1 and 100 μ g/kg per day. The inhibition of CYP19A1 was accompanied by a decreased estradiol serum concentration, augmented follicular atresia, and increased caspase 3-associated apoptosis in ovarian cells. These events occurred from the lowest dose (1 μ g/kg per day), and CYP19A1 diminution was even more pronounced after exposure to this dose compared to that with 100 μ g/kg per day.⁴⁶

The majority of the studies performed in teleost fishes evaluate the effects of BPA on *cyp19a1a* and *19a1b* subtypes. Both genes are key players in the regulation of estrogen levels, sexual differentiation, and reproduction. *cyp19a1b* is also implicated in neuronal development and neuroprotection. *cyp19a1a* and *cyp19a1b* are mostly expressed in the ovaries and brain, respectively, but other localizations have been evidenced.³⁹ Both forms are expressed at low level in the testis. In whole rare minnow (*Gobiocypris rarus*) juveniles, BPA strongly suppressed *cyp19a1b* gene expression at the concentrations of 0.1, 1, and 10 nM and significantly decreased

cyp19a1a gene expression only at the higher concentration.⁴⁷ However, in gonads of rare minnows exposed to 5, 15, and 50 $\mu\text{g/L}$ BPA (ca. 22, 66, and 220 nM), Liu et al. reported an elevation in cyp11a1 mRNA expression in the testis and ovary, and in cyp17a1 and 19a1a only in the ovary. These inductions of mRNA expression were more pronounced at the intermediate dose of 15 $\mu\text{g/L}$.⁴⁸ In zebrafish (*Danio rerio*), BPA increased cyp19a1b mRNA expression at concentrations ranging from 10 nM to 10 μM in a dose-dependent manner but do not affect cyp19a1a in the whole embryo.⁴⁹

In Vitro Studies. Incubation of microsomes from rat and human testis with BPA (10 μM) showed that CYP17A1 is inhibited by BPA and that human CYP17A1 is more sensitive than rat CYP17A1.⁵⁰ The authors also showed that BPA concentration-dependently inhibited the production of testosterone by Leydig cells.⁵⁰ In another study, treatment of primary testicular Leydig cells from adult rats with 0.01 nM BPA for 18 h was found to decrease CYP17A1 and 19A1 mRNA expression, impairing testosterone and estradiol biosynthesis.⁵¹ A third study showed that BPA (0.1 to 10 nM for 72 h) induced a time- and concentration-dependent increase in CYP19A1 transcripts, protein levels, and enzyme activity in the rat Leydig R2C cell line, with a concomitant decrease of testosterone synthesis.⁵² In addition, the authors suggested that BPA-induced CYP19A1 activation was mediated by cyclooxygenase-2 up regulation. However, the impact of BPA on CYP11A1 and 17A1 was not evaluated.⁵²

Several other studies were performed in cells from female origin. The study by Zhou et al. investigated the effects of BPA on steroid hormone production in rat ovarian theca interstitial cells and granulosa cells.⁵³ In theca interstitial cells incubated for 72 h with BPA (0.1 μM to 100 μM), CYP17A1 and 11A1 mRNA were increased as well as testosterone levels. In granulosa cells, BPA increased progesterone and CYP11A1 mRNA but decreased estradiol levels and CYP19A1 mRNA expression.⁵³ This induction of CYP11A1 mRNA was not found in the culture of antral follicles incubated up to 4 days with 10 and 100 $\mu\text{g/mL}$ BPA. On the contrary, CYP11A1 mRNA as well as progesterone, testosterone, and estradiol levels were decreased after exposure to BPA. All these changes were reversible upon BPA removal from the medium.⁵⁴ Watanabe et al. also showed a down-regulation of CYP19A1 mRNA and an inhibition of the enzyme activity in human ovarian granulosa-like (KGN) and osteoblastic (SV-HFO) cell lines treated with BPA (5–100 μM).⁵⁵ In human KGN cells and granulosa cells from women undergoing *in vitro* fertilization, BPA (40–100 μM) reduced CYP19A1 mRNA as well as estradiol secretion in a dose-dependent manner.⁵⁶ This work suggested that BPA induced primarily the peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) γ expression, which mediated thereafter the down-regulation of CP19A1 and estradiol. As reported above, estradiol and CYP19A1 diminution were confirmed *in vivo* in the same species.⁴⁶ In the human placental cell line JEG3 (choriocarcinoma) and in PL30 cells derived from the third-term trimester placental tissue, BPA (5–100 μM) also reduced CYP19A1 mRNA expression and activity in a dose-dependent manner. In JEG3 cells treated with 100 μM BPA for 24 h, aromatase activity was totally abolished.⁵⁷ This may potentially affect estrogen synthesis, which is crucial in the maintenance of human pregnancy. Zhang et al. studied the effects of BPA on steroidogenesis using HE95R human female adrenocortical carcinoma cells.⁵⁸ This cell line is unique in expressing all the

enzymes implicated in steroidogenic pathways. After exposure of the cells to concentrations ranging from 1.31 nM up to 13.1 μM for 24 h, hormones were measured in the culture medium. Testosterone and androstenedione levels started decreasing at 131 nM, whereas progesterone, estrone, and estradiol levels increased only at the higher concentration tested. CYP17A1 knock down in these cells also strongly decreased androstenedione and testosterone production. The authors demonstrated that BPA interferes more with the 17,20-lyase activity of CYP17A1 than with its 17-hydroxylase activity. Unexpectedly, estrone and estradiol levels were increased despite the fact that the medium concentrations of their respective precursors were reduced. An inhibition of estrogen endogenous metabolism might be the primary mechanism causing this increase, rather than the greater activity of CYP19A1.⁵⁸

In summary, most studies seem to indicate that BPA induces CYP19A1 mRNA activity or protein level in male rodents and in cultured Leydig cells. On the contrary, CYP19A1 is decreased in the majority of the studies performed on female rodents and ovary cells from rat and human origin. One pilot *in vivo* human study was conducted with 61 women undergoing *in vitro* fertilization at the Massachusetts General Hospital. An association between exposure to BPA, estimated from urinary concentrations, and CYP19A1 gene expression in granulosa cells was evaluated. The authors did not find clear dose-response association but could not rule out the possibility of a nonmonotonic association.⁵⁹ Considering the number of studies and the diversity of the models, these findings appear to be robust. Two studies reported an inhibition of CYP17A1 in males, and it was either unchanged or increased in female rodents or cells, depending on the studies. Concerning CYP11A1, no trend could be found between studies showing an induction, an inhibition, or no change after BPA exposure.

■ EFFECTS ON GLUTATHIONE-S-TRANSFERASES

GSTs form a major group of phase 2 enzymes involved in detoxification and cellular protection against chemical and oxidative stress. The compounds detoxified by GSTs include a large array of xenobiotics. Some GSTs are also implicated in the endogenous reduction of lipid peroxidation products. GSTs are found in the cytoplasm of cells but also in mitochondria and the endoplasmic reticulum. Cytosolic GSTs are divided into 7 families, i.e., the alpha, mu, pi, sigma, theta, zeta, and omega families. Mitochondrial GSTs belong to the kappa family. Three classes of microsomal-bound GSTs have been identified and share no sequence similarity with the cytosolic GSTs. GSTs can be induced by multiple pathways implying different nuclear receptors such as AhR, PXR, PPAR γ , or the nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2).⁶⁰

Pregnant ICR mice were exposed by daily gavage to BPA (0.02, 2, 200, and 20,000 $\mu\text{g/kg}$ per day) from 6.5 to 13.5 and 6.5 to 17.5 dpc, sacrificed 24 h after the last administration of BPA, and embryos were rapidly removed and dissected.¹⁶ GSTA1/2 mRNA expression was increased in the cerebra, the cerebellum, and gonads of 14.5 and 18.5 dpc male and female embryos, only at the two highest doses. However, Ahr mRNA expression was enhanced starting from the lowest dose, which roughly represents 1/100 of the environmental exposure. In the liver, GSTA1/2 protein levels were also slightly increased in 18.5 dpc embryos, again at the two highest doses.¹⁶ It was recently suggested that micromolar concentrations of BPA could activate the expression of genes regulated by the Nrf1/2 antioxidant response element (ARE) in HEK 293 cells.⁶¹ In this

Table 2. Summary of BPA Modulator Effects on Phase 2 and 3 Enzymes in Different Organs from Different Species

phase 2 and 3 enzymes	species (strain)	tissue	model, route ^a exposure ^b	doses, concentrations length and (period) ^c of treatment	change (R, A, P) ^d isoform	refs	
GST	mouse (ICR)	cerebra, cerebellum, gonads, liver	<i>in vivo</i> , PO, fetal	0.2–20 mg/kg/d (J6.5–J17.5 dpc)	↑ (R, P) A1/A2	16	
	rat (Wistar)	liver	<i>in vivo</i> , PO, chronic	50 mg/kg/d for 28 d	↓ (R, A)	62	
	fish (zebrafish)	whole embryo	<i>in vivo</i> , water	1 μg–1 mg/L (from 4 to 168 h after fertilization)	↓ (A)	63	
	invertebrates (mussel)	digestive glands	<i>in vivo</i> injection	3–60 ng/g for 24 h	↑ (A)	64	
	(mussel)	digestive glands	injection	0.0177–177 μg/L for 24 h	↑ (R) P1	65	
	(snail)	gills, digestive glands	water	1–100 μg/L for 2 to 15 d	↑ (A)	66	
	(Daphnia)	whole organism	water	0.1–20 mg/L for 48 h	↑ (A)	67	
				0.86–13.8 mg/L for 21 d	↑ (A)		
		human	liver	<i>in vivo</i> , human exposure	35.4–56.1 ng/g liver ^e	↓ (R) A5	68
	SULT	human	liver	HepG2 cells	80 μM for 24 and 48 h	↓ (R, P) 1E1 ↓ (R) 1A1	72
			<i>in vivo</i> , human exposure	35.4–56.1 ng/g liver ^e	↓ (R) 2A1, 1B1, 6B1, 1C3	68	
UGT	human	liver	<i>in vivo</i> , human exposure	35.4–56.1 ng/g liver ^e	↓ (R) 1A3, 1A4, 1A6, 1A8, 1A9, 1A10	68	
			microsomes	100 μM	↓ (A) 1A6	74	
				25 μM	↓ (A) 1A1, 1A6	75	
			HepG2 cells	80 μM for 24 and 48 h	↓ (R, P) 2B7 ↓ (R) 2B15	72	
			recombinant UGTs	100 μM	↓ (A) 2B4, 2B7, 2B15, 2B17	76	
		rat	liver	microsomes	25 μM	↓ (A) 1A1, 1A6	75
transporters	human	liver	HepG2 cells	80 μM for 24 h	↑ (R, P) MRP1, 2 ↑ (R) MDR1 = (P) MDR1	72	
		kidney	HEK cells	100 μM	↓ (A) BCRP = (A) MRP1, 4, MDR1	80	
		trophoblast	BeWo cells	10 μM for 48 h	↓ (P) MDR1	81	
	mouse	adipocytes	T3T-F442A cells	100 μM for 24 h	↑ (P) GLUT4	82	
	rat (Wistar)	testis	<i>in vivo</i> , PO, chronic	0.005–500 μg/kg/d for 45 d	↓ (P) GLUT2, GLUT8	83, 84	

^aRoute of exposure (PO, per os; SC, subcutaneously; IP, intraperitoneally). ^bWhen not specified, the mode of exposure is acute or repeated for a few days in adults. ^cThe period of treatment is indicated when the exposure is perinatal. ^dChanges in mRNA (R), protein (P) expression, or activity (A) are indicated in parentheses, followed by the name of the isoform when it is known. ^eConcentrations detected in the liver.

study, 2 ARE-target genes (HO-1 and NQO-1) were evaluated, and both gene expressions were slightly increased (2-fold) at high concentrations (100 and 200 μM). Thus, the Nrf1/2 pathway activation could be a mechanism by which BPA induces GST expression. On the contrary, in an experiment conducted with adult rats, administration of 50 mg/kg per day for 4 weeks led to an important diminution of GST mRNA expression and activity in the liver, whereas treatments with lower doses had no effect.⁶² BPA also induced a significant dose-dependent (1 μg to 1 mg/L) inhibition of GST activity after short-term exposure of zebrafish embryos (from 4 to 168 h postfertilization)⁶³ but not in other invertebrate species. Indeed, GST activity was generally enhanced in marine bivalve mollusks (*Mytilus galloprovincialis*),^{64,65} freshwater snails (*Bellamya purificata*),⁶⁶ or daphnia (*Daphnia magna*)⁶⁷ acutely or chronically exposed to various concentrations of BPA (range 0.0177 μg/L–20 mg/L). The results of these studies are not consistent, but this may be due to species differences, the type of exposure (perinatal/adult), or the lack of information on the specific studied GST isoform. Several studies deal with GSTs in general, and indeed, one GST can be induced while another is inhibited. In humans, only one study was reported and showed

a decrease of GSTA5 gene expression in human fetal livers exhibiting high tissue BPA concentrations.⁶⁸ In this study, tissue samples from patients undergoing abortions during first and second trimesters of pregnancy were processed for RNA extraction and BPA measurement. Total BPA concentrations ranged from 0.071 ng/g (below the limit of quantification) to 96.8 ng/g.⁶⁸ All these effects are summarized in Table 2.

■ EFFECTS ON SULFOTRANSFERASES

The SULTs are a superfamily of phase 2 enzymes that detoxify substrates by the addition of a sulfonate group. SULTs allow the elimination of xenobiotics and the sulfonation of endogenous molecules. Thus, the modulation of SULTs can alter xenobiotic disposition and endogenous metabolic processes. Major human SULTs belong to SULT1 and 2 families and are differentially expressed in the liver, small intestine, kidneys, and lungs.⁶⁹ SULT expression is regulated by numerous nuclear receptors including PPARs, PXR, CAR, liver X receptors, farnesoid X receptor (FXR), retinoid-related orphan receptors, and estrogen-related receptors.⁷⁰

As for GSTs, only few works examined the interactions of BPA with SULTs (Table 2). In human fetal livers, Nahar et al.

showed by PCR array that the mRNA expression of several SULTs (1B1, 1C3, 2A1, and 6B1) was strongly inhibited in tissues showing high BPA concentrations (35.4–56.1 ng/g) compared to low BPA concentrations (1.2–2.9 ng/g).⁶⁸ Another study evidenced an induction of SULT1E1 mRNA and protein in the livers of obese female mice exposed *in utero* and for 12 weeks after weaning to a mixture of pollutants including BPA at doses in the range of the TDI.⁷¹ However, this induction may not be linked to BPA as an *in vitro* study in liver hepatoma HepG2 cells showed that BPA (80 μM for 24 and 48 h) reduced SULT1A1 and 1E1 mRNA expression and SULT1E1 protein level.⁷²

■ EFFECTS ON UDP-GLUCURONOSYLTRANSFERASES

Human phase 2 UGTs form a superfamily divided into 5 families and 6 subfamilies on the basis of sequence homology.⁷³ Subfamilies 1A and 2B play a key role in the detoxification of nonpolar compounds. These enzymes catalyze the glucuronidation process, i.e., the covalent binding of glucuronic acid to an appropriate substrate. Orthologous UGTs have been identified in rats, although interspecies variations do exist. UGTs are regulated by epigenetic processes, tissue-specific transcription factors such as hepatocyte nuclear factor 1 α and 4, and transcription factors modulated by ligands, including CAR, PXR, FXR, PPARs, AhR, and Nrf2.⁷³

Most studies on the interactions between BPA and UGTs show an inhibition of the activity and mRNA expression of rat or human UGTs (Table 2). The study by Nahar et al. showed that mRNA expression of UGT1A3, 1A4, 1A6, 1A8, 1A9, and 1A10 was decreased in human fetal livers exhibiting high BPA levels.⁶⁸ Hanioka et al. showed that UGT1A6 activity was dose-dependently inhibited in microsomes from human livers (with K_i values of 84.9 and 72.3 μM using serotonin and 4-methylumbelliferone as substrates, respectively) and in microsomes from yeast cells expressing human UGT1A6 (with K_i values of 65.5 and 42.5 μM , respectively).⁷⁴ Moreover, BPA (25 μM) was also able to inhibit the glucuronidation of genistein in rat and human liver microsomes with respective K_i values of 35.7 and 58.7 μM .⁷⁵ In both species, this process involved predominantly UGT1A1 and 1A6. Interestingly, this inhibition was noncompetitive in human microsomes and competitive in rat microsomes. Using *in vitro* recombinant UGT-catalyzed 4-methylumbelliferone glucuronidation as a probe reaction, Jiang et al. found that BPA (100 μM) exerted a stronger inhibition toward the UGT2B subfamily than the UGT1A subfamily. BPA exhibited a competitive inhibition for UGT2B4 and non-competitive inhibition for UGT2B7, 2B15, and 2B17.⁷⁶

An *in vitro* study in HepG2 cells treated with 80 μM BPA for 24 h showed no effect on UGT1A1 mRNA but a diminution of UGT2B7 and 2B15 mRNA expression. UGT2B7 protein levels were also decreased.⁷²

■ EFFECTS ON TRANSPORTERS

Transporters also referred to as phase 3 metabolizing enzymes can be divided into 2 major families: the ATP-binding cassette (ABC) superfamily⁷⁷ and the solute carrier (SLC) family.⁷⁸ ABC transporters are primarily efflux transporters, whereas SLC family members present broader properties as they facilitate cellular influx, efflux, or are bidirectional. FXR, PXR, CAR, PPARs, and the retinoic acid receptor are important

regulatory transcription factors for the hepatic ABC transporters.⁷⁹

There are only *in vitro* studies reporting BPA effects on ABC transporters. In HepG2 cells, the impact of BPA on transporters involved in estradiol metabolism was investigated. Exposition of the cells to 80 μM BPA for 24 h induced an increase of the mRNA expression of the multidrug-resistance protein (MDR)1 (also referred to as P-gp and ABCB1) and the multidrug resistance-associated proteins (MRP)1 (ABCC1), MRP2 (ABCC2), and MRP3 (ABCC3) but not MRP4 (ABCC4). A clear augmentation of the protein level was observed only for MRP2 and MRP3.⁷² Dankers et al., explored the effect of BPA on breast-cancer-resistance protein (BCRP and ABCG2), MRP1, MRP4, and P-gp in membrane vesicles from human embryonic kidney (HEK) cells overexpressing these transporters. BPA inhibited BCRP at the highest tested concentration (i.e., 100 μM) but had no effect on the other transporters (P-gp, MRP1, and MRP4).⁸⁰ Using BeWo cells as an *in vitro* model for human trophoblasts, Jin and Audus showed that BPA (10 μM) increased P-gp levels and markedly decreased calcein accumulation in the cells, indicating stimulated P-gp-mediated efflux, probably by a direct effect on P-gp.⁸¹

There are few studies reporting interactions between BPA and SLC transporters. To our knowledge, the effects of BPA have only been investigated on glucose transporters (GLUT). Indeed, BPA affects glucose homeostasis and insulin signaling, and the role of glucose transporters has been investigated in this context. Sakurai et al. showed that BPA (100 μM) treatment of mouse T3T-F442A adipocytes increased GLUT4 (SLC2A4) protein levels and eventually enhanced glucose uptake.⁸² The effects of BPA (0.005 to 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per day) orally administered to rats for 45 days on GLUT8 and GLUT2 (SLC2A8 and SLC2A2) were investigated in the testis.^{83,84} Western blot analyses revealed a dose-dependent decrease of GLUT8 and GLUT2 protein levels starting from the lowest dose for GLUT8 (20% at 0.005 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per day) and from the second lowest dose for GLUT2 (20% at 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per day). Interestingly, both doses are far below the TDI. Immunofluorescent staining showed that spermatocytes and developing spermatids were particularly affected. Molecular docking of BPA and glucose with GLUT2 and GLUT8 revealed a higher binding affinity of BPA for both transporters than glucose.⁸⁴ The decline of these two transporters in the testis may subsequently alter testicular functions as glucose is essential for testosterone production.

■ CONCLUSIONS

In conclusion, BPA is able to induce or inhibit numerous metabolizing enzymes. Xenobiotic-metabolizing CYP appear to be frequently inhibited (CYP1A, 2A, 2B, 2C, 2D, and 2E) in rodents as well as in humans. However, CYP3A family members seem to be unchanged or decreased in animal models but induced in human cell models. For the CYP4 family, reports showed a trend toward an induction. Differences between animal and human models illustrate the complexity of the extrapolation of animal data to human beings. For CYP families metabolizing endogenous derivatives such as CYP19 and CYP17, animal and cellular studies consistently suggest gender specificity. Most of them report that BPA induces CYP19A1 and inhibits CYP17A1 in males, whereas the opposite is observed in female. In males, the inhibition of CYP17A1 is expected to reduce the conversion of pregnenolone and

progesterone to androstenedione and testosterone, respectively, thus leading to lower levels of androgens. In addition, the induction of CYP19A1 should enhance the transformation of these androgens to estrogens, worsening the diminution of male hormones. Combined with its estrogen receptor ligand properties, these effects on CYP17 and CYP19 could participate in the feminization potential of BPA. However, it must be pointed out that this potential is still debated. Indeed, although several studies showed a feminization of invertebrates, fishes, reptiles, or birds upon BPA exposure,⁸⁵ this phenomenon occurs at concentrations higher than those found in the environment. Interestingly, concerning phase 2 enzymes, an inhibition of the activity and mRNA expression of several rat or human UGTs and SULTs was constantly reported, suggesting that BPA could alter the detoxification pathway. In contrast, effects of BPA on GST and transporters are not well documented and show no specific trend. Indeed, depending on the enzyme, BPA could exert different effects. Clearly, further investigations are needed in order to better characterize the effects of BPA on metabolizing enzymes, especially in humans. As the industry and scientists are intensively seeking for alternatives to BPA, the effects of these compounds should also be tested. In addition, it will be important to determine whether BPA and its substitutes can have a real impact on the biotransformation of a significant number of endogenous and exogenous derivatives.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel: +33 2 23 23 30 44. Fax: +33 2 23 23 53 85. E-mail: Bernard.fromenty@inserm.fr.

Funding

This work was supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR) [contract PERINATOX 2010 CESA 005 03].

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ABBREVIATIONS

AA4H, acetanilide 4-hydroxylase; ABC, ATP-binding cassette; Ahr, aryl hydrocarbon receptor; ARE, antioxidant response element; BCRP, breast cancer resistance protein; BPA, bisphenol A; CAR, constitutive androstane receptor; CYP, cytochrome P450; dpc, days *postcoitum*; ECOD, 7-ethoxycoumarin O-deethylase; ED2H, estradiol 2-hydroxylase; EFSA, European Food Safety Agency; EROD, 7-ethoxyresorufin O-deethylase; FXR, farnesoid X receptor; GLUT, glucose transporter; GST, glutathione-S-transferase; LAOH, lauric acid ω -hydroxylation; MDR, multidrug-resistance protein; MRP, multidrug resistance-associated proteins; NOAEL, no adverse effect level; Nrf2, factor-erythroid 2-related factor 2; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; PXR, pregnane X receptor; SLC, solute carrier; SULT, sulfotransferase; T16BH, testosterone 16 β -hydroxylase; T2BH, testosterone 2 β -hydroxylase; T6BH, testosterone 6 β -hydroxylase; TDI, tolerable daily intake; UGT, UDP-glucuronosyltransferase

REFERENCES

(1) Snyder, R. W., Maness, S. C., Gaido, K. W., Welsch, F., Sumner, S. C., and Fennell, T. R. (2000) Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168, 225–234.

(2) Pritchett, J. J., Kuester, R. K., and Sipes, I. G. (2002) Metabolism of bisphenol A in primary cultured hepatocytes from mice, rats, and humans. *Drug Metab. Dispos.* 30, 1180–1185.

(3) Völkel, W., Colnot, T., Csanády, G. A., Filser, J. G., and Dekant, W. (2002) Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 1281–1287.

(4) Matthews, J. B., Twomey, K., and Zacharewski, T. R. (2001) In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 149–57.

(5) Hanioka, N., Naito, T., and Narimatsu, S. (2008) Human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in bisphenol A glucuronidation. *Chemosphere* 74, 33–36.

(6) Yokota, H., Iwano, H., Endo, M., Kobayashi, T., Inoue, H., Ikushiro, S., and Yuasa, A. (1999) Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem. J.* 340, 405–409.

(7) Elsby, R., Maggs, J. L., Ashby, J., and Park, B. K. (2001) Comparison of the modulatory effects of human and rat liver microsomal metabolism on the estrogenicity of bisphenol A: implications for extrapolation to humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297, 103–113.

(8) Zalko, D., Soto, A. M., Dolo, L., Dorio, C., Rathahao, E., Debrauwer, L., Faure, R., and Cravedi, J. P. (2003) Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environ. Health Perspect.* 111, 309–319.

(9) Yoshihara, S., Makishima, M., Suzuki, N., and Ohta, S. (2001) Metabolic activation of bisphenol A by rat liver S9 fraction. *Toxicol. Sci.* 62, 221–227.

(10) Schmidt, J., Kotnik, P., Trontelj, J., Knez, Ž., and Mašič, L. P. (2013) Bioactivation of bisphenol A and its analogs (BPF, BPAF, BPZ and DMBPA) in human liver microsomes. *Toxicol. in Vitro* 27, 1267–1276.

(11) Peretz, J., Vrooman, L., Ricke, W. A., Hunt, P. A., Ehrlich, S., Hauser, R., Padmanabhan, V., Taylor, H. S., Swan, S. H., VandeVoort, C. A., and Flaws, J. A. (2014) Bisphenol A and Reproductive Health: Update of Experimental and Human Evidence, 2007–2013. *Environ. Health Perspect.* 122, 775–786.

(12) Mirmira, P., and Evans-Molina, C. (2014) Bisphenol A, obesity, and type 2 diabetes mellitus: genuine concern or unnecessary preoccupation? *Transl. Res.* 164, 13–21.

(13) Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Jr., Lee, D. H., Shioda, T., Soto, A. M., vom Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T., and Myers, J. P. (2012) Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and non-monotonic dose responses. *Endocr. Rev.* 33, 378–455.

(14) Vandenberg, L. N. (2014) Low-dose effects of hormones and endocrine disruptors. *Vitam. Horm.* 94, 129–165.

(15) Vandenberg, L. N., Chahoud, I., Heindel, J. J., Padmanabhan, V., Paumgarten, F. J., and Schoenfelder, G. (2010) Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ. Health Perspect.* 118, 1055–1070.

(16) Nishizawa, H., Imanishi, S., and Manabe, N. (2005) Effects of exposure in utero to bisphenol A on the expression of aryl hydrocarbon receptor, related factors, and xenobiotic metabolizing enzymes in murine embryos. *J. Reprod. Dev.* 51, 593–605.

(17) Hanioka, N., Jinno, H., Nishimura, T., and Ando, M. (1998) Suppression of male-specific cytochrome P450 isoforms by bisphenol A in rat liver. *Arch. Toxicol.* 72, 387–394.

(18) Martucci, C. P., and Fishman, J. (1993) P450 enzymes of estrogen metabolism. *Pharmacol. Ther.* 57, 237–257.

(19) Hammond, D. K., Zhu, B. T., Wang, M. Y., Ricci, M. J., and Liehr, J. G. (1997) Cytochrome P450 metabolism of estradiol in hamster liver and kidney. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145, 54–60.

(20) Nieminen, P., Lindström-Seppä, P., Mustonen, A. M., Mussalo-Rauhamaa, H., and Kukkonen, J. V. (2002) Bisphenol A affects

endocrine physiology and biotransformation enzyme activities of the field vole (*Microtus agrestis*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 126, 183–189.

(21) Jeong, H. G., Kimand, J. Y., and Choi, C. Y. (2000) Down-regulation of murine Cyp1a-1 in mouse hepatoma Hepa-1c1c7 cells by bisphenol A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277, 594–598.

(22) Hanioka, N., Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Nishimura, T., and Ando, M. (2000) Interaction of bisphenol A with rat hepatic cytochrome P450 enzymes. *Chemosphere* 41, 973–978.

(23) Donato, M. T., Castell, J. V., and Gómez-Lechón, M. J. (1999) Characterization of drug metabolizing activities in pig hepatocytes for use in bioartificial liver devices: comparison with other hepatic cellular models. *J. Hepatol.* 31, 542–549.

(24) Pfeiffer, E., and Metzler, M. (2004) Effect of bisphenol A on drug metabolising enzymes in rat hepatic microsomes and precision-cut rat liver slices. *Arch. Toxicol.* 78, 369–377.

(25) Ryan, D. E., and Levin, W. (1990) Purification and characterization of hepatic microsomal cytochrome P-450. *Pharmacol. Ther.* 45, 153–239.

(26) Chen, Y., and Goldstein, J. A. (2009) The transcriptional regulation of the human CYP2C genes. *Curr. Drug Metab.* 10, 567–578.

(27) Schenkman, J. B., Thummel, K. E., and Favreau, L. V. (1989) Physiological and pathophysiological alterations in rat hepatic cytochrome P-450. *Drug Metab. Rev.* 20, 557–584.

(28) Niwa, T., Tsutsui, M., Kishimoto, K., Yabusaki, Y., Ishibashi, F., and Katagiri, M. (2000) Inhibition of drug-metabolizing enzyme activity in human hepatic cytochrome P450s by bisphenol A. *Biol. Pharm. Bull.* 23, 498–501.

(29) Cannon, J. M., Kostoryz, E., Russo, K. A., Smith, R. E., and Yourtee, D. M. (2000) Bisphenol A and its biomaterial monomer derivatives alteration of in vitro cytochrome P450 metabolism in rat, minipig, and human. *Biomacromolecules* 1, 656–664.

(30) Luo, G., Guenther, T., Gan, L. S., and Humphreys, W. G. (2004) CYP3A4 induction by xenobiotics: biochemistry, experimental methods and impact on drug discovery and development. *Curr. Drug Metab.* 5, 483–505.

(31) Tompkins, L. M., and Wallace, A. D. (2007) Mechanisms of cytochrome P450 induction. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 21, 176–181.

(32) Koutsounas, I., Theocharis, S., Patsouris, E., and Giaginis, C. (2013) Pregnane X receptor (PXR) at the crossroads of human metabolism and disease. *Curr. Drug Metab.* 14, 341–350.

(33) Chen, Y., Tang, Y., Guo, C., Wang, J., Boral, D., and Nie, D. (2012) Nuclear receptors in the multidrug resistance through the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters. *Biochem. Pharmacol.* 83, 1112–1126.

(34) Masuyama, H., Hiramatsu, Y., Kunitomi, M., Kudo, T., and MacDonald, P. N. (2000) Endocrine disrupting chemicals, phthalic acid and nonylphenol, activate Pregnane X receptor-mediated transcription. *Mol. Endocrinol.* 14, 421–428.

(35) Takeshita, A., Koibuchi, N., Oka, J., Taguchi, M., Shishiba, Y., and Ozawa, Y. (2001) Bisphenol-A, an environmental estrogen, activates the human orphan nuclear receptor, steroid and xenobiotic receptor-mediated transcription. *Eur. J. Endocrinol.* 145, 513–517.

(36) Kuzbari, O., Peterson, C. M., Franklin, M. R., Hathaway, L. B., Johnstone, E. B., Hammoud, A. O., and Lamb, J. G. (2013) Comparative analysis of human CYP3A4 and rat CYP3A1 induction and relevant gene expression by bisphenol A and diethylstilbestrol: implications for toxicity testing paradigms. *Reprod. Toxicol.* 37, 24–30.

(37) Kretschmer, X. C., and Baldwin, W. S. (2005) CAR and PXR: xenosensors of endocrine disrupters. *Chem.-Biol. Interact.* 155, 111–128.

(38) Sui, Y., Ai, N., Park, S. H., Rios-Pilier, J., Perkins, J. T., Welsh, W. J., and Zhou, C. (2012) Bisphenol A and its analogues activate human pregnane X receptor. *Environ. Health Perspect.* 120, 399–405.

(39) Cheshenko, K., Pakdel, F., Segner, H., Kah, O., and Eggen, R. I. (2008) Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 155, 31–62.

(40) Castro, B., Sánchez, P., Torres, J. M., Preda, O., del Moral, R. G., and Ortega, E. (2013) Bisphenol A exposure during adulthood alters expression of aromatase and 5 α -reductase isozymes in rat prostate. *PLoS One* 8, e55905.

(41) Castro, B., Sánchez, P., Torres, J. M., and Ortega, E. (2013) Effects of adult exposure to bisphenol a on genes involved in the physiopathology of rat prefrontal cortex. *PLoS One* 8, e73584.

(42) Ellem, S. J., Schmitt, J. F., Pedersen, J. S., Frydenberg, M., and Risbridger, G. P. (2004) Local aromatase expression in human prostate is altered in malignancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 2434–2441.

(43) Rubin, B. S., Lenkowski, J. R., Schaeberle, C. M., Vandenberg, L. N., Ronsheim, P. M., and Soto, A. M. (2006) Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A. *Endocrinology* 147, 3681–3691.

(44) Wolstenholme, J. T., Rissman, E. F., and Connelly, J. J. (2011) The role of Bisphenol A in shaping the brain, epigenome and behavior. *Horm. Behav.* 59, 296–305.

(45) Arase, S., Ishii, K., Igarashi, K., Aisaki, K., Yoshio, Y., Matsushima, A., Shimohigashi, Y., Arima, K., Kanno, J., and Sugimura, Y. (2011) Endocrine disrupter bisphenol A increases in situ estrogen production in the mouse urogenital sinus. *Biol. Reprod.* 84, 734–742.

(46) Lee, S. G., Kim, J. Y., Chung, J. Y., Kim, Y. J., Park, J. E., Oh, S., Yoon, Y. D., Yoo, K. S., Yoo, Y. H., and Kim, J. M. (2013) Bisphenol A exposure during adulthood causes augmentation of follicular atresia and luteal regression by decreasing 17 β -estradiol synthesis via downregulation of aromatase in rat ovary. *Environ. Health Perspect.* 121, 663–669.

(47) Wang, J., Liu, X., Wang, H., Wu, T., Hu, X., Qin, F., and Wang, Z. (2010) Expression of two cytochrome P450 aromatase genes is regulated by endocrine disrupting chemicals in rare minnow *Gobiocypris rarus* juveniles. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* 152, 313–320.

(48) Liu, S., Qin, F., Wang, H., Wu, T., Zhang, Y., Zheng, Y., Li, M., and Wang, Z. (2012) Effects of 17 α -ethinylestradiol and bisphenol A on steroidogenic messenger ribonucleic acid levels in the rare minnow gonads. *Aquat. Toxicol.* 122–123, 19–27.

(49) Kishida, M., McLellan, M., Miranda, J. A., and Callard, G. V. (2001) Estrogen and xenoestrogens upregulate the brain aromatase isoform (P450aromB) and perturb markers of early development in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* 129, 261–268.

(50) Ye, L., Zhao, B., Hu, G., Chu, Y., and Ge, R. S. (2011) Inhibition of human and rat testicular steroidogenic enzyme activities by bisphenol A. *Toxicol. Lett.* 207, 137–142.

(51) Akingbemi, B. T., Sottas, C. M., Koulova, A. I., Klinefelter, G. R., and Hardy, M. P. (2004) Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology* 145, 592–603.

(52) Kim, J. Y., Han, E. H., Kim, H. G., Oh, K. N., Kim, S. K., Lee, K. Y., and Jeong, H. G. (2010) Bisphenol A-induced aromatase activation is mediated by cyclooxygenase-2 up-regulation in rat testicular Leydig cells. *Toxicol. Lett.* 193, 200–208.

(53) Zhou, W., Liu, J., Liao, L., Han, S., and Liu, J. (2008) Effect of bisphenol A on steroid hormone production in rat ovarian theca-interstitial and granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 283, 12–18.

(54) Peretz, J., and Flaws, J. A. (2013) Bisphenol A down-regulates rate-limiting Cyp11a1 to acutely inhibit steroidogenesis in cultured mouse antral follicles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 271, 249–256.

(55) Watanabe, M., Ohno, S., and Nakajin, S. (2012) Effects of bisphenol A on the expression of cytochrome P450 aromatase (CYP19) in human fetal osteoblastic and granulosa cell-like cell lines. *Toxicol. Lett.* 210, 95–99.

(56) Kwintkiewicz, J., Nishi, Y., Yanase, T., and Giudice, L. C. (2010) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma mediates bisphenol A inhibition of FSH-stimulated IGF-1, aromatase, and estradiol in human granulosa cells. *Environ. Health Perspect.* 118, 400–406.

- (57) Huang, H., and Leung, L. K. (2009) Bisphenol A downregulates CYP19 transcription in JEG-3 cells. *Toxicol. Lett.* 189, 248–252.
- (58) Zhang, X., Chang, H., Wiseman, S., He, Y., Higley, E., Jones, P., Wong, C. K., Al-Khedhairi, A., Giesy, J. P., and Hecker, M. (2011) Bisphenol A disrupts steroidogenesis in human H295R cells. *Toxicol. Sci.* 121, 320–327.
- (59) Ehrlich, S., Williams, P. L., Hauser, R., Missmer, S. A., Peretz, J., Calafat, A. M., and Flaws, J. A. (2013) Urinary bisphenol A concentrations and cytochrome P450 19 A1 (Cyp19) gene expression in ovarian granulosa cells: An in vivo human study. *Reprod. Toxicol.* 42, 18–23.
- (60) Higgins, L. G., and Hayes, J. D. (2011) Mechanisms of induction of cytosolic and microsomal glutathione transferase (GST) genes by xenobiotics and pro-inflammatory agents. *Drug Metab. Rev.* 43, 92–137.
- (61) Chepelev, N. L., Enikanolaiye, M. I., Chepelev, L. L., Almohaisen, A., Chen, Q., Scoggan, K. A., Coughlan, M. C., Cao, X. L., Jin, X., and Willmore, W. G. (2013) Bisphenol A activates the Nrf1/2-antioxidant response element pathway in HEK 293 cells. *Chem. Res. Toxicol.* 26, 498–506.
- (62) Hassan, Z. K., Eloheid, M. A., Virk, P., Omer, S. A., ElAmin, M., Daghestani, M. H., and AlOlayan, E. M. (2012) Bisphenol A induces hepatotoxicity through oxidative stress in rat model. *Oxid. Med. Cell. Longevity* 2012, 194829.
- (63) Wu, M., Xu, H., Shen, Y., Qiu, W., and Yang, M. (2011) Oxidative stress in zebrafish embryos induced by short-term exposure to bisphenol A, nonylphenol, and their mixture. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 2335–2341.
- (64) Canesi, L., Borghi, C., Ciacci, C., Fabbri, R., Vergani, L., and Gallo, G. (2007) Bisphenol-A alters gene expression and functional parameters in molluscan hepatopancreas. *Mol. Cell. Endocrinol.* 276, 36–44.
- (65) Canesi, L., Borghi, C., Ciacci, C., Fabbri, R., Lorusso, L. C., Vergani, L., Marcomini, A., and Poiana, G. (2008) Short-term effects of environmentally relevant concentrations of EDC mixtures on *Mytilus galloprovincialis* digestive gland. *Aquat. Toxicol.* 87, 272–279.
- (66) Li, X., Lin, L., Luan, T., Yang, L., and Lan, C. (2008) Effects of landfill leachate effluent and bisphenol A on glutathione and glutathione-related enzymes in the gills and digestive glands of the freshwater snail *Bellamya purificata*. *Chemosphere* 70, 1903–1909.
- (67) Jemec, A., Tišler, T., Erjavec, B., and Pintar, A. (2012) Antioxidant responses and whole-organism changes in *Daphnia magna* acutely and chronically exposed to endocrine disruptor bisphenol A. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 86, 213–218.
- (68) Nahar, M. S., Kim, J. H., Sartor, M. A., and Dolinoy, D. C. (2014) Bisphenol A-associated alterations in the expression and epigenetic regulation of genes encoding xenobiotic metabolizing enzymes in human fetal liver. *Environ. Mol. Mutagen.* 55, 184–195.
- (69) James, M. O., and Ambadapadi, S. (2013) Interactions of cytosolic sulfotransferases with xenobiotics. *Drug Metab. Rev.* 45, 401–414.
- (70) Runge-Morris, M., Kocarek, T. A., and Falany, C. N. (2013) Regulation of the cytosolic sulfotransferases by nuclear receptors. *Drug Metab. Rev.* 45, 15–33.
- (71) Naville, D., Pinteaur, C., Vega, N., Menade, Y., Vigier, M., Le Bourdais, A., Labaronne, E., Debard, C., Luquain-Costaz, C., Bégeot, M., Vidal, H., and Le Magueresse-Battistoni, B. (2013) Low-dose food contaminants trigger sex-specific, hepatic metabolic changes in the progeny of obese mice. *FASEB J.* 27, 3860–3870.
- (72) Hanet, N., Lancon, A., Delmas, D., Jannin, B., Chagnon, M. C., Cherkaoui-Malki, M., Latruffe, N., Artur, Y., and Heydel, J. M. (2008) Effects of endocrine disruptors on genes associated with 17beta-estradiol metabolism and excretion. *Steroids* 73, 1242–1251.
- (73) Rowland, A., Miners, J. O., and Mackenzie, P. I. (2013) The UDP-glucuronosyltransferases: their role in drug metabolism and detoxification. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 1121–1132.
- (74) Hanioka, N., Takeda, Y., Tanaka-Kagawa, T., Hayashi, K., Jinno, H., and Narimatsu, S. (2008) Interaction of bisphenol A with human UDP-glucuronosyltransferase 1A6 enzyme. *Environ. Toxicol.* 23, 407–412.
- (75) Coughlin, J. L., Thomas, P. E., and Buckley, B. (2012) Inhibition of genistein glucuronidation by bisphenol A in human and rat liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 40, 481–485.
- (76) Jiang, H. M., Fang, Z. Z., Cao, Y. F., Hu, C. M., Sun, X. Y., Hong, M., Yang, L., Ge, G. B., Liu, Y., Zhang, Y. Y., Dong, Q., and Liu, R. J. (2013) New insights for the risk of bisphenol A: inhibition of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs). *Chemosphere* 93, 1189–1193.
- (77) Han, H. K. (2011) Role of transporters in drug interactions. *Arch. Pharm. Res.* 34, 1865–1877.
- (78) Hediger, M. A., Cléménçon, B., Burrier, R. E., and Bruford, E. A. (2013) The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction. *Mol. Aspects Med.* 34, 95–107.
- (79) Karpen, S. J. (2002) Nuclear receptor regulation of hepatic function. *J. Hepatol.* 36, 832–850.
- (80) Dankers, A. C., Roelofs, M. J., Piersma, A. H., Sweep, F. C., Russel, F. G., van den Berg, M., van Duursen, M. B., and Masereeuw, R. (2013) Endocrine disruptors differentially target ATP-binding cassette transporters in the blood-testis barrier and affect leydig cell testosterone secretion in vitro. *Toxicol. Sci.* 136, 382–391.
- (81) Jin, H., and Audus, K. L. (2005) Effect of bisphenol A on drug efflux in BeWo, a human trophoblast-like cell line. *Placenta* 26 (Suppl A), S96–S103.
- (82) Sakurai, K., Kawazuma, M., Adachi, T., Harigaya, T., Saito, Y., Hashimoto, N., and Mori, C. (2004) Bisphenol A affects glucose transport in mouse 3T3-F442A adipocytes. *Br. J. Pharmacol.* 141, 209–214.
- (83) D’Cruz, S. C., Jubendradass, R., Jayakanthan, M., Rani, S. J., and Mathur, P. P. (2012) Bisphenol A impairs insulin signaling and glucose homeostasis and decreases steroidogenesis in rat testis: an in vivo and in silico study. *Food Chem. Toxicol.* 50, 1124–1133.
- (84) D’Cruz, S. C., Jubendradass, R., and Mathur, P. P. (2012) Bisphenol A induces oxidative stress and decreases levels of insulin receptor substrate 2 and glucose transporter 8 in rat testis. *Reprod. Sci.* 19, 163–172.
- (85) Crain, D. A., Eriksen, M., Iguchi, T., Jobling, S., Laufer, H., LeBlanc, G. A., and Guillette, L. J., Jr. (2007) An ecological assessment of bisphenol-A: evidence from comparative biology. *Reprod. Toxicol.* 24, 225–239.

II. RESULTATS

1. Cadre et but du travail

De par son environnement, l'Homme est constamment exposé à de nombreux xénobiotiques. Ces contaminants sont souvent reconnus comme des mutagènes et/ou des carcinogènes chez l'animal mais pour beaucoup d'entre eux, leur génotoxicité est seulement suspectée chez l'Homme.

Le programme REACH a été mis en place dans le but de préciser les risques vis-à-vis de la santé humaine de plus de 30 000 molécules. Cependant, à cette échelle, le coût prohibitif engendré par l'utilisation de modèle animaux accroît la nécessité de développer de nouvelles méthodes *in vitro*. Ce développement inclut notamment la caractérisation de nouveaux modèles cellulaires et la mise au point de nouveaux tests. Il est nécessaire d'avoir à disposition des modèles pertinents exprimant les enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques afin de prendre en compte la détoxification mais aussi l'activation métabolique souvent indispensable à l'expression du potentiel toxique d'une molécule.

Concernant l'évaluation génotoxique, les données existantes démontrent que les batteries de tests actuels possèdent une bonne sensibilité. En revanche, leur manque de spécificité (taux élevé de faux positifs) constitue un réel problème en regard du nombre de molécules à évaluer dans le programme REACH. De plus, ces tests ne permettent pas de prendre en compte l'effet d'une exposition chronique et les modèles utilisés semblent peu pertinents en regard de leur faible capacité de biotransformation. Cet aspect de chronicité est particulièrement important puisqu'il a pour but de «mimer» l'exposition de l'Homme aux contaminants environnementaux. De plus, une exposition chronique aux xénobiotiques peut conduire à une augmentation de l'expression de certaines enzymes et accroître leur potentiel toxique.

Mes travaux se sont inscrits dans le cadre d'un projet financé par l'Agence Nationale de la Recherche, portant sur le développement de nouvelles stratégies *in vitro* pour l'évaluation de la cytotoxicité et de la génotoxicité des contaminants de l'environnement (Projet ANR NISTEC). Il s'est articulé autour du modèle cellulaire HepaRG, celui-ci présente l'avantage d'exprimer la plupart des enzymes du métabolisme des xénobiotiques à des niveaux proches des hépatocytes humains. Cette caractéristique, essentielle pour évaluer le métabolisme et

l'hépatotoxicité des xénobiotiques, constitue un atout majeur. De plus, ce modèle peut être utilisé dans le cadre d'études chroniques puisqu'il présente un phénotype stable sur plusieurs semaines.

Ces cellules sont relativement bien caractérisées du point de vue de l'expression des enzymes du métabolisme des xénobiotiques, cependant notre laboratoire poursuit la caractérisation et l'exploitation de ce modèle. Dans ce contexte, notre équipe s'est intéressée à l'expression et à l'activité du CYP2E1. Ce CYP, induit dans certaines physiopathologies et impliqué dans le développement de stéatohépatites, semble être exprimé dans les cellules HepaRG mais l'activité enzymatique n'a pas été totalement caractérisée.

Durant cette thèse, mes travaux ont été conduits avec les objectifs suivants : adapter, développer et caractériser le modèle HepaRG pour l'étude du métabolisme et de la toxicité des xénobiotiques.

✓ **Adapter ce modèle à un test de génotoxicité haut débit : le test des histones γ -H2AX phosphorylées**

Il n'existe pas à l'heure actuelle de test de génotoxicité haut-débit utilisant un modèle métaboliquement compétent et permettant d'évaluer les effets d'une exposition chronique aux xénobiotiques. Ce premier objectif a consisté à développer et valider le marquage des histones γ H2AX phosphorylées dans les cellules HepaRG après exposition à des contaminants environnementaux.

✓ **Développer des modèles recombinants biosenseurs exprimant un gène rapporteur sous le contrôle de divers promoteurs des EMXs**

Les EMXs responsables de la formation de métabolites réactifs sont souvent induits par le xénobiotique lui-même. Ce phénomène est responsable d'une toxicité accrue de certains xénobiotiques et augmente le risque d'interaction médicamenteuse. Des lignées recombinantes biosenseurs pour les principales EMXs de phase I et II devraient permettre de détecter précocement ce phénomène.

✓ **Expression et activité du cytochrome P450 2E1 dans les modèles de culture d'hépatocytes**

Afin de caractériser l'activité du CYP2E1 dans les modèles de cellules d'hépatome et les hépatocytes primaires, nous avons établi deux lignées recombinantes HepG2 et HepaRG surexprimant le CYP2E1. A l'aide de ces modèles et d'hépatocytes en culture primaire, notre

objectif a été de mesurer l'activité du CYP2E1 en utilisant comme substrat la chlorzoxazone et en mesurant le métabolite primaire dépendant de l'activité CYP2E1, mais également de prendre en compte le métabolisme de phase II de la chlorzoxazone.

2. Article 1

Evaluation of genotoxicity using automated detection of γ H2AX in metabolically competent HepaRG cells

Nicolas QUESNOT^{1,2}, Karine RONDEL^{1,2}, Sophie MARTINAIS^{1,2}, Marc AUDEBERT³,
Denise GLAISE^{1,2}, Fabrice MOREL^{1,2}, Pascal LOYER^{1,2*}, Marie-Anne ROBIN^{1,2*}

¹INSERM, UMR991, Liver, Metabolisms and Cancer, CHU Pontchaillou, F-35033 Rennes;

²Université de Rennes 1, F-35043 Rennes

³INRA, UMR1331, Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, F-31027 Toulouse, France

Cet article soumis dans le journal Mutagenesis est actuellement en révision

TITLE:

Evaluation of genotoxicity using automated detection of γ H2AX in metabolically competent HepaRG cells.

Nicolas QUESNOT^{1, 2}, Karine RONDEL^{1, 2}, Sophie MARTINAIS^{1, 2}, Marc AUDEBERT³, Denise GLAISE^{1, 2}, Fabrice MOREL^{1, 2}, Pascal LOYER^{1, 2*§}, Marie-Anne ROBIN^{1, 2*}

¹INSERM, UMR991, Liver, Metabolisms and Cancer, CHU Pontchaillou, F-35033 Rennes;

²Université de Rennes 1, F-35043 Rennes

³INRA, UMR1331, Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, F-31027 Toulouse, France

* These authors have contributed to this work equally

Running Head : γ H2AX in metabolically competent HepaRG cells.

§ CORRESPONDING AUTHOR: LOYER Pascal, UMR 991, Liver, Metabolisms and Cancer, CHU Pontchaillou, F-35043 Rennes, France. Phone: 0033 (0)223233870, Fax: 0033 (0)299540137, e-mail: pascal.loyer@univ-rennes1.fr

KEYWORDS : Genotoxicity, γ H2AX, drug screening, HepaRG cells.

ABBREVIATIONS: CYP450: cytochrome P450 ; DMSO: dimethyl sulfoxide ; XMEs: xenobiotic-metabolizing enzymes ; γ H2AX: phosphorylated H2A histone family member X ; IC₅₀: half-maximal inhibitory concentration ; MTT: 3-[4.5-dimethylthi-azol-2-yl]-2.5-diphenyltetrazolium bromide.

ABSTRACT

The *in situ* detection of γ H2AX was recently reported to be a promising biomarker of genotoxicity. In addition, the human HepaRG hepatoma cells appear to be relevant for investigating hepatic genotoxicity since they express most of drug metabolizing enzymes and a wild type p53. The aim of this study was to determine whether the automated *in situ* detection of γ H2AX positive HepaRG cells could be relevant for evaluation of acute and chronic genotoxicity compared to micronucleus assay. Metabolically competent HepaRG cells were treated daily with environmental contaminants and genotoxicity was evaluated after 1, 7 and 14 days. Using these cells, we confirmed the genotoxicity of aflatoxin B1 and benzo(a)pyrene and demonstrated that dimethylbenzanthracene, fipronil and endosulfan previously found genotoxic with comet or micronucleus assays also induced γ H2AX staining. Furthermore, we showed for the first time in hepatic cells that fluoranthene and bisphenol A induced γ H2AX while no effect had been previously reported in HepG2 cells. In addition, induction of γ H2AX was observed with some compounds only after 7 days, highlighting the importance of studying long term effects of low doses of contaminants. Together, our data demonstrate that automated γ H2AX detection in metabolically competent HepaRG cells is a suitable high-through put genotoxicity screening assay.

INTRODUCTION

Human exposure to a broad range of toxic compounds is virtually unavoidable because of the increasing contamination of air, water and food. Numerous environmental pollutants and food contaminants are known to induce mutagenesis and cancers in animals but they are, with a few exceptions such as the aflatoxin B1 and benzo(a)pyrene, only suspected to exert mutagenic effects in Human. However, chronic exposure to low doses of thousands of synthetic compounds generated by industries is strongly suspected to cause health issues, especially cancers. Therefore, the evaluation of the genetic toxicity of these chemicals remains a challenge.

The initial genotoxicity testing relies on a large battery of *in vitro* assays (1) that show a high sensitivity but suffer from a lack of specificity with an abnormally high rate of false positives compared to carcinogenicity studies in rodents (2). This led authors to propose follow-up actions to further discriminate the chemicals that trigger genetic mutations by combining for each compound data on toxicity, genotoxicity, physicochemical properties and metabolism (3, 4). However, there is still an obvious need to develop innovative methods for genotoxicity risk assessment to improve the prediction of acute and also chronic genotoxicity (1).

The liver is the major organ involved in the biotransformation of xenobiotics since it receives the blood stream coming from the digestive tract and that the adult hepatocytes express the most abundant panel of drug metabolizing enzymes (5). The liver is the prime target of toxic xenobiotics and their down-stream reactive metabolites as demonstrated by the fact that drug-induced liver toxicity is the most frequent cause for the withdrawal from the market of approved medications (6). Because of the poor correlation between human and animal toxicity of chemicals, human primary hepatocytes are recognized as the most pertinent cells for xenobiotic metabolism and toxicity studies (5). Their use is, however, limited because of their reduced life-span and the overall decrease in the expression of liver specific functions including xenobiotic-metabolizing enzymes (XMEs) in standard culture conditions (5). In addition, large variations in functional activities of XME have been reported in human hepatocytes isolated from different donors and the scarce and unpredictable availability of human biopsies limit considerably their use.

Hepatoma cell lines are an alternative to normal hepatocytes for genotoxicity studies (7-9). However, most cell lines have reduced expression of most XMEs compared to primary cells

(10), which may limit the assessment of genotoxicity mediated by downstream metabolites. The human HepaRG hepatoma cells are bipotent hepatic progenitors with high proliferation potential that exhibit the remarkable ability to differentiate into biliary and hepatocyte-like cells (11). This cell model represents a unique “*in vitro* system” to investigate the molecular pathways of hepatocyte differentiation (11). HepaRG hepatocyte-like cells express most of the major phase I, II and III enzymes (12, 13) and are now used worldwide as an alternative *in vitro* model to primary hepatocytes for studying metabolism and toxicity of xenobiotics (14-16).

Differentiated HepaRG hepatocyte-like cells seem particularly suitable for the prediction of genotoxicity (16-21). These metabolically competent cells can be kept confluent and quiescent over several weeks while retaining a long-term expression of XMEs, which is a useful feature for chronic toxicity and genotoxicity studies. In addition, they can re-enter the cell cycle and proliferate when plated at low density, which allows comet and micronucleus assays (20). Furthermore, they express a wild type tumor suppressor *p53* gene (11) and retinoblastoma protein (Dubois-Pot-Schneider H. and Corlu A., personal communication) two major regulators of DNA repair and cell cycle damage check-point.

A novel *in vitro* genotoxicity assay has been recently developed based on the *in situ* detection of the phosphorylation of the histone H2AX in human cells (7-9, 22, 23). The phosphorylation of the histone H2AX also called γ H2AX occurs after a DNA double strand break in cell genome and reflects a global genotoxic insult that may originate from different types of DNA damage (4, 24). The aim of this study was to determine whether the γ H2AX assay in HepaRG hepatocyte-like cells using an automated *in situ* detection of positive cells could be relevant for acute and chronic toxicity and genotoxicity studies compared to micronucleus assay. Ten environmental contaminants including the mycotoxin aflatoxin B1 (AFB1), the alkylating agent methyl methane sulfonate (MMS), the organochlorine insecticide and acaricide endosulfan (Endo), the phenylpyrazole class insecticide fipronil (Fipro), the brominated flame retardant tetrabromo-bisphenol A (TBBPA), three polycyclic aromatic hydrocarbons [benzo[a]pyrene (BaP), dimethylbenzanthracene (DMBA), fluoranthene (Fluo)] and two plasticizers [bisphenol A (BPA) and diethylhexylphthalate (DEHP)] were used to study γ H2AX induction. While some of these compounds, such as AFB1 and B(a)P are known to induce genotoxicity, controversial results have been reported for others like fluoranthene and bisphenol A.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

The environmental contaminants (Supplementary data 1): Aflatoxin B₁ (AFB₁), benzo[a]pyrene (B[a]P), bisphenol A (BPA), diethylhexyl phthalate (DEHP), 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA), endosufan (Endo), fipronil (Fipro), fluoranthene (Fluo), methyl methanesulfonate (MMS), tetrabromobisphenol A (TBBPA) and insulin were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). William's E medium was purchased from Eurobio (Les Ulis, France). Fetal calf serum (FCS) was obtained from Lonza (Levallois-Perret, France). Penicillin, streptomycin and L-glutamine were purchased by Life Technologies (Saint Aubin, France).

HepaRG cell culture and treatment conditions

The HepaRG cells were seeded at a density of 3×10^4 cells/cm² and cultured in William's E medium supplemented with 10% of FCS, 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, 5 µg/mL insulin, 2 mM L-glutamine and 50 µM hydrocortisone hemisuccinate. After 2 weeks, cells were cultured in the same medium supplemented with 2% dimethylsulfoxide (DMSO) for two more weeks prior to selective seeding of hepatocytes-like cells at a density of 1.6×10^5 cells/cm². For toxicity assays, cells were exposed daily to contaminants according to the protocol (Supplementary data 2). William's E medium was supplemented with 2% FCS and 1% DMSO for acute and chronic treatments.

MTT assay

The cytotoxicity was assessed using the Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT). Briefly, cells were incubated with MTT (0.5 mg/mL) in William's medium without FCS for 1 h at 37°C. The formed crystals were dissolved in DMSO at room temperature for 10 min and the absorbance was read at 490 nm with a microplate reader (Polarstar Omega, BMG Labtech). The MTT values reflecting the number of viable cells were expressed in percentage relatively to the absorbance determined in control cultures. IC₅₀ were calculated using linear regression and expressed as mean ± SEM (the standard error of the mean) of at least three independent experiments.

γ H2AX and micronucleus assays

γ -H2AX test was performed using Cellomics™ Phospho-H2AX Activation kit (Thermo scientific) following the manufacturer's instruction. Briefly, after treatment of 1, 7 or 14 days, cells were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS), fixed with 3.7 % formaldehyde in PBS for 15 min at room temperature before permeabilization using 0.1 % saponin. Nonspecific binding was blocked by incubating the cells with 2 % of fetal bovine serum diluted with the manufacturer buffer for 15 min. Then, the cells were incubated with anti-phospho-H2AX antibody solution for 1 h at room temperature. Following washes with the buffer provided, the Dylight 549-labeled secondary antibody solution containing Hoechst 33342 dye (1 μ g/mL) was incubated for 45 min. After washing, the plate was read on Cellomics™ Arrayscan VTI HCS Reader (Thermo Scientific) and at least ten pictures per well in triplicate were analyzed corresponding to a minimum of 6000 cells scored. The green fluorescence corresponding to γ -H2AX foci and co-localizing with Hoechst was integrated and weighted with nuclear number. The treated culture was compared to control condition in order to obtain an induction factor. Relative cell count [RCC or final cell count (treated) /final cell count (control) X 100] was also assessed by the automated counting of Hoechst-stained nuclei in order to compare with the MTT data.

The micronucleus assay was performed as previously described (18). Briefly, after selective seeding in 48 well plates, cells were daily treated for 1 or 7 days prior to 3 days treatment with human Epidermal Growth Factor (EGF). Cells were fixed for 10 min in 4 % paraformaldehyde before permeabilization with PBS containing 10 % donkey serum and 0.1 % saponin. F-actin was labeled with 1/400 phalloidin conjugated to sulforhodamine for 20 min and nuclei stained with Hoechst 33342 (1 μ g/mL) for 5 min. Ten images per wells were taken with Cellomics™ HCS Reader. The number of nuclei was automatically assessed by image analysis using Image J software while micronuclei were manually and blindly scored. At least 5 pictures were scored until to reach a total of 2500 cells. All experiments were performed in triplicate. Criteria used for identifying micronuclei were: area less than one-third the nucleus, no overlap with the nucleus (distinct borders) and same aspect as the chromatin. The induction factor calculated corresponds to the ratio of the number of micronucleated cells in treated cultures compared to the number of MN cells in solvent cultures.

Data analysis

Genotoxicity was considered positive when treatments produced a level of toxicity $\leq 50\%$ [decrease in MTT or final cell count (RCC)] and induced at least a statistically significant 1.5 fold increase in γ H2AX staining or micronucleus count (24). Error bars represent the standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed using Student's *t*-test. Statistically significant increases in H2AX phosphorylation after treatment were compared with controls using Student's test with Excel software; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

RESULTS

We first measured the acute and chronic cytotoxicity in order to determine the IC_{50} of the 10 environmental contaminants in HepaRG hepatocyte-like cells (Supplementary data 1). In our experimental conditions, the differentiation status of HepaRG cells was maintained over the 14 days of treatment as demonstrated by the constant CYP3A4 expression level (Supplementary data 2). The cells were exposed to high concentrations of each compound with a single exposure for 24 h or to lower concentrations of each contaminant for daily treatments during 7 and 14 days (Supplementary data 1). The cytotoxicity was evaluated using the MTT assay at 1, 7 or 14 days and IC_{50} were calculated (Table 1).

With the exception of the Fluo and MMS, the cumulative treatments resulted in enhanced cytotoxic effects over time with decreasing IC_{50} between 24 h and 7 days. For instance, a 35-fold IC_{50} decrease was observed for the B(a)P. Prolonging the treatment up to 14 days kept on lowering significantly IC_{50} of AFB1 (0.4 μ M to 0.1 μ M after 7 and 14 days, respectively), B(a)P (10 to 7 μ M), DMBA (12 to 6 μ M), Endo (57 to 8 μ M) and TBBPA (38 to 25 μ M). We were unable to reach toxic concentrations with DEHP because its poor aqueous solubility. Treatment with DEHP up to 2 mM for 14 days only produced morphological change.

It is widely admitted that *in vitro* genotoxicity assays must be performed at concentrations of compounds that maintained the viability of treated cultures above the IC_{50} value (24). In this study, we selected 3 to 4 doses of each compound (Supplementary data 1 and Table 1) inducing moderate levels of cytotoxicity to perform the γ H2AX assay (Supplementary data 3) with automated detection using the Cellomics™ device (Figure 1). On separate 96-well plates, we confirmed with the MTT assay that the viability remained for all compounds above 50 % of the value obtained for control cultures demonstrating that these concentrations were compatible with genotoxicity studies on HepaRG cells.

Since the γ H2AX assay is based on an automated approach, we evaluated whether an all-in-one assay double staining combining the γ H2AX assay and the counting of Hoechst 33342-stained nuclei could provide a cytotoxicity endpoint in order to avoid performing a separate MTT assay. The Relative Cells Count (RCC) was established from the count of Hoechst-stained nuclei and was compared to MTT assay (Supplementary data 4). The two methods provided very similar results although for high concentrations of DMBA and Endo, viability levels appeared higher when using MTT. This result is in accordance with a previous study

(23). However, regardless of the test used, the levels of cytotoxicity induced by the selected doses remained below 50 % of the control which was the maximum cytotoxicity level accepted for genotoxicity observation.

Polycyclic aromatic hydrocarbons [B(a)P, DMBA and Fluo], AFB1, MMS, Endo and BPA showed a significant induction of H2AX positive cell index after 24 h whereas DEHP, TBBPA and Fipro did not (Figure 1). Interestingly, we showed for the first time in HepaRG cells the genotoxicity of Fluo (10 μ M) and BPA (40 μ M) at 24 h using γ H2AX assay. These compounds did not show any effect on HepG2 cells in previously reported data performed, however, at lower doses (8, 9). We next investigated the γ H2AX staining following one or two weeks of drug exposure at low doses. Fipro that did not enhance H2AX staining after 24 h induced genotoxicity after 7 or 14 days. For BPA, Fluo, and B(a)P that increased the γ H2AX index at 24 h, the response became negative after chronic exposure over 7 and 14 days of treatment. Interestingly, a single exposure to 100 μ M DMBA induced a 1.7-fold increase in the γ H2AX positive cell number at 24 h and a 12-fold increase after 7 days at concentrations of 0.5 to 4 μ M. The continuous exposure up to 14 days did not further enhance the γ H2AX induction compared to the 7 day-exposure. Finally, the TBBPA and DEHP showed no effect on γ H2AX staining.

In order to further validate the sensitivity of the γ H2AX assay, we quantified the micronuclei in HepaRG cells exposed to AFB1, B(a)P, BPA, Fipro and DMBA for 1 or 7 days before mitogenic stimulation by EGF for 3 days and visualization of Hoechst-stained micronuclei (Table 2). AFB1, B(a)P, Fipro and DMBA significantly increased the percentage of micronuclei confirming that the γ H2AX assay provided relevant genotoxicity data correlating with the micronucleus assay in the HepaRG hepatocyte-like cells. The correlation was particularly evidenced for DMBA and AFB1 which gave a concentration and time-dependent response after 1 and 7 days of treatment. In contrast, BPA transiently induced γ H2AX at 24h but not at 7 days and did not significantly increase micronuclei whereas the genotoxicity of Fipro appeared detectable only after 7 days of treatment in the two tests. These data reinforce the conclusion that γ H2AX is a promising biomarker of genotoxicity complementing the data obtained with the micronucleus assay as previously reported in HepG2 cells (24).

DISCUSSION

Our results confirmed and extended previously published *in vitro* genotoxicity data (Table 3) with the same compounds and using the comet, micronucleus and/or γ H2AX assays. All compounds [AFB1, MMS, Endo, Fipro, DMBA and B(a)P] known to induce genotoxicity in various cell models also increased γ H2AX index in HepaRG cells. However, the genotoxicity of Fipro and Endo previously reported using comet or micronucleus assays in human hepatic cells (Table 3) was here evidenced with the γ H2AX staining. Moreover, for all these compounds, the concentrations inducing the γ H2AX activation in HepaRG cells were compatible with data available in the literature (Table 3) with the exception of the Fipro inducing genotoxicity at 20 μ M in HepaRG cells while lower concentrations of 0.2 μ M and 1.6 μ M were found positive in peripheral blood cells using the micronucleus and comet assays, respectively (25). Both TBBPA and DEHP were negative in the γ H2AX performed in HepaRG cells. There are no data showing genotoxicity of TBBPA in human cells although DNA damage was documented in liver cells of the fish fathead minnows (26). Although DEHP was found negative in most non-mammalian *in vitro* mutation assays, it was reported positive in comet assay in HepG2 cells (27).

The differences in the effective concentrations of compounds inducing γ H2AX and/or micronuclei between HepG2 (Table 3) and HepaRG are most likely related to the larger panel of phase I and II metabolising enzymes expressed in HepaRG cells (12-15). For instance, AFB1 is converted into the highly reactive 8,9-epoxide metabolite by the CYP3A4, which is expressed at a much higher level in HepaRG cells. This could explain why low doses of 0.025 to 0.1 μ M were genotoxic in HepaRG compared to doses of 0.1 (24) to 1 μ M (28) in HepG2 cells. We also showed that the effective concentration of Endo in HepaRG is lower than the lowest effective doses found in HepG2 cells (29). Similarly, HepG2 transformants expressing high levels of CYP3A4 are more sensitive to Endo than the parental cells (30). Conversely, the compounds that do not require metabolic activation to form genotoxic metabolite(s) are likely to appear less genotoxic with higher effective concentrations in HepaRG cells since they will be metabolized by phase I and II enzymes and secreted by phase III transporters also expressed at high levels in HepaRG cells (31).

The discrepancies on the magnitude and the timing of the genotoxicity between the two different assays may rely on the fact that γ H2AX and micronucleus tests are based on

different parameters and evidenced different stages/steps of genotoxicity. The detection of phosphorylated histone H2AX reflects an early response to genotoxic insults resulting from diverse DNA damages such as DNA strand break and DNA adducts and the downstream activation of DNA repair machineries. In contrast, the micronucleus assay detects late phenomenon resulting from chromosomal breakages and/or mitotic catastrophes. Furthermore, the two tests are performed using quiescent and proliferating cells for γ H2AX and micronucleus assays, respectively. These two tests performed in HepaRG cells should not be considered mutually exclusive and both assays provide important information on the mechanisms of genotoxicity.

In conclusion, this work is the first study applying metabolically competent HepaRG cells for high-throughput screening of genotoxicity using automated detection of γ H2AX and demonstrates that this assay is suitable for genotoxicity and cytotoxicity screening in liver cells. In addition, the induction of γ H2AX observed with some of the molecules only after 7-day exposures highlight the importance of studying the long term effects of low doses of contaminants. The HepaRG hepatocyte-like cells are suitable for chronic genotoxicity studies because they express a large set of drug metabolising enzymes (12) and show long-term functional stability during chronic treatments (16). Besides the metabolic capacity, an important aspect for genotoxicity studies is the fact that HepaRG cells express wild type tumor suppressors *p53* and retinoblastoma protein, two major pathways regulating DNA repair and damage check-point during the cell cycle. It was previously reported that the use of human cells bearing functional p53 reduces the rate of false positive results in genotoxicity assays (32).

Together, our data suggest that with detection of γ H2AX in HepaRG cells can be useful in acute and chronic genetic toxicology. Other carcinogenic and *in vivo* genotoxic compounds with different modes of action but also negative compounds need to be tested on HepaRG cells to confirm these conclusions.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

FUNDING

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) [contract NISTEC ANR-09-CESA-003-002] and the Institut National de la santé et de la Recherche Médicale (Inserm, France). Nicolas Quesnot received a fellowship from the Région Bretagne and Ligue contre le Cancer, Comité Départemental des Côtes d'Armor (22).

ACKNOWLEDGEMENT

We thank the platform ImpACcell (Biogenouest and Institut Fédératif de Recherche de Rennes) for the automated detection of γ H2AX, Dr. Daniel Zalko for fruitful suggestions and Drs Anne Corlu and Caroline Aninat for critical reading of the manuscript.

The authors would like to dedicate this article to Dr Marie-Anne Robin who passed away during the preparation of the manuscript. Marie-Anne Robin was an exceptional scientist and friend whose enthusiasm for life and belief in science will continue to inspire all of us who were privileged to know her.

REFERENCES

1. Suter, W., (2006) Predictive value of in vitro safety studies. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 10, 362-366.
2. Kirland, D.J., Hayashi, M., Jacobson-Kram, D., Kasper, P., *et al.*, (2007) Summary of major conclusions from the 4th IGWT San Francisco, 9-10 September, 2005. *Mutat. Res.*, 627, 6-9.
3. Dearfield, K.L., Thybaud, V., Cimino, M.C., Custer, L., *et al.*, (2011) Follow-up actions from positive results of in vitro genetic toxicity testing. *Environ. Mol. Mutagen.*, 52, 177-204.
4. Bryce S.M., Bemis, J.C., Mereness, J.A., Spellman, R.A., *et al.*, (2014) Interpreting in vitro micronucleus positive results: simple biomarker matrix discriminates clastogens, aneugens, and misleading positive agents. *Environ. Mol. Mutagen.*, 55, 542-555.
5. Guillouzo, A., and Guguen-Guillouzo, C., (2008) Evolving concepts in liver tissue modeling and implications for in vitro toxicology. *Expert Opin. Drug. Metab. Toxicol.*, 4, 1279-1294.
6. Lasser, K.E., Allen, P.D., Woolhandler, S.J., Himmelstein, D.U., *et al.*, (2002) Timing of new black box warnings and withdrawal for prescription medications. *JAMA*, 287, 2215-2220.
7. Audebert, M., Riu, A., Jacques, C., Hillenweck, A., *et al.*, (2010) Use of the γ H2AX assay for assessing the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell lines. *Toxicol. Lett.*, 199, 182-192.
8. Audebert, M., Dolo, L., Perdu, E., Cravedi, *et al.*, (2011) Use of the γ H2AX assay for assessing the genotoxicity of bisphenol A and bisphenol F in human cell lines. *Arch. Toxicol.*, 85, 1463-1473.
9. Audebert, M., Zeman, F., Beaudouin, R., Péry, A., *et al.*, (2012) Comparative potency approach based on H2AX assay for estimating the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Tox. Appl. Pharmacol.*, 260, 58-64.
10. Wilkening, S., Stahl, F., and Bader A., (2003) Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab. Dispos.*, 31, 1035-1042.
11. Cerec, V., Glaise, D., Garnier, D., Morosan, S., *et al.*, (2007) Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology*, 45, 957-967.
12. Aninat, C., Piton, A., Glaise, D., Le Charpentier, T., *et al.*, (2006) Expression of cytochrome P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab. Dispos.*, 34, 75-83.

13. Dumont, J., Jossé, R., Lambert, C., Anthérieu, S., *et al.*, (2010) Preferential induction of the AhR gene battery in HepaRG cells after a single or repeated exposure to heterocyclic aromatic amines. *Tox. Appl. Pharmacol.*, **249**, 91-100.
14. Legendre, C., Hori, T., Loyer, P., Aninat, C., *et al.*, (2009) Drug-metabolising enzymes are down-regulated by hypoxia in differentiated human hepatoma HepaRG cells: HIF1- α involvement in CYP3A4 repression. *Eur. J. Cancer*, **12**, 2882-2892.
15. Kanebratt, K.P., and Andersson, T.B., (2008) Evaluation of HepaRG cells as an in vitro model for human drug metabolism studies. *Drug Metab. Dispos.*, **36**, 1444-52.
16. Jossé, R., Aninat, C., Glaise, D., Dumont, J., *et al.*, (2008) Long-term functional stability of HepaRG hepatocytes and use for chronic toxicity and genotoxicity studies. *Drug Metab. Dispos.*, **36**, 1111-1118.
17. Le Hegarat, L., Dumont, J., Jossé, R., Huet, S., *et al.*, (2010) Assessment of the genotoxicity potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cells by the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, **25**, 555-560.
18. Jossé, R., Rogue, A., Lorge, E., Guillouzo, A., (2012) An adaptation of the human HepaRG cells to the in vitro micronucleus assay. *Mutagenesis*, **27**, 295-304.
19. Jetten, M.J.A., Kleinjans, J.C.S., Claessen, S.M., Chesné, C., *et al.*, (2013) Baseline and genotoxic compound induced gene expression profiles in HepG2 and HepaRG compared to primary human hepatocytes. *Toxicol. In Vitro*, **27**, 2031-2040.
20. Le Hegarat, L., Mourrot, A., Huet, S., Vasseur, L., *et al.*, (2014) Performance of comet and micronucleus assays in metabolic competent HepaRG cells to predict in vivo genotoxicity. *Toxicol. Sci.*, **138**, 300-309.
21. Ordonez P., Sierra A.B., Camacho, O.M., Baxter, A., *et al.*, (2014) Nicotine, cotinine, and b-nicotyrine inhibit NNK-induced DNA-strand break in the hepatic cell line HepaRG. *Toxicol. In Vitro*, **28**, 1329-1337.
22. Graillot, V., Tomasetig, F., Cravedi, J-P., Audebert, M., (2012) Evidence of the in vitro genotoxicity of methyl-pyrazole pesticides in human cells. *Mut. Res.*, **748**, 8-16.
23. Graillot, V., Takakura, N., Le Hegarat, L., Fessard, V., *et al.*, (2012) Genotoxicity of pesticide mixtures present in the diet of the French population. *Environ. Mol. Mutagen.*, **53**, 173-184.
24. Khoury, L., Zalko, D., Audebert, M., (2013) Validation of high-throughput genotoxicity assay screening using γ H2AX in-cell western assay on HepG2 cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, **54**, 737-746.
25. Celik, A., Ekinci, S.Y., Güler, G., Yildirim, S., (2014) In vitro genotoxicity of fipronil sister chromatid exchange, cytokinesis block micronucleus test, and comet assay. *DNA Cell. Biol.*, **33**, 148-154.

26. Berr, J.S., Stapleton, H.M., Mitchelmore, C.L., (2010) Accumulation and DNA damage in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to 2 brominated flame-retardant mixtures, firemaster 550 and firemaster BZ-54. *Environ. Toxicol. Chem.*, 29, 722-729.
27. Choi, S.Y. Park, J. Jeong, E. Cho, S., *et al.*, (2010) Identification of toxicological biomarkers of di(2-ethylhexyl) phthalate in proteins secreted by HepG2 cells using proteomic analysis. *Proteomics*, 10, 1831–1846.
28. Magkoufopoulou, C., Claessen, S.M.H., Jennen, D.G.J., Kleinjans, J.C.S., *et al.*, (2011) Comparison of phenotypic and transcriptomic effects of false-positive genotoxins, true genotoxins and non-genotoxins using HepG2. *Mutagenesis*, 26, 593-604.
29. Lu, Y., Morimoto, K., Takeshita, T., Takeuchi, T. *et al.*, (2000) Genotoxic effects of a-endosulfan and b-endosulfan on human HepG2 cells. *Environ. Health. Perspect.*, 108, 559-561.
30. Hashizume, T., Yoshitomi, S., Asahi, S., Uematsu, R., *et al.*, (2010) Advantages of human hepatocyte-derived transformants expressing a series of human cytochrome P450 isoforms for genotoxicity examination. *Toxicol. Sci.*, 116, 488-497.
31. Le Vee, M., Noel, G., Jouan, E., Stieger, B. *et al.*, (2013) Polarized expression of drug transporters in differentiated human hepatoma HepaRG cells *Toxicol. In Vitro*, 27, 1979-1986.
32. Fowler, P., Smith, K., Young, J., Jeffrey, L., *et al.*, (2012) Reduction of misleading ("false") positive results in mammalian cell genotoxicity assays. I. Choice of cell type. *Mut. Res.*, 742, 11-25.
33. Iso, T., Watanabe, T., Iwamoto, T., Shimamoto, A., *et al.*, (2006) DNA damage caused by bisphenol A and estradiol through estrogenic activity. *Biol. Pharm. Bull.*, 29, 206-210.
34. Müller-Tegethoff, K., Kasper, P., Müller, L., (1995) Evaluation studies on the in vitro rat hepatocyte micronucleus assay. *Mut. Res.*, 335, 293-307.
35. Erkekoglu, P., Rachidi, W., Yuzugullu, O.G., Giray, B., *et al.*, (2010) Evaluation of cytotoxicity and oxidative DNA damaging effects of di(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) and mono(2-ethylhexyl)-phthalate (MEHP) on MA-10 Leydig cells and protection by selenium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 248, 52-62. *Erratum in Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2013, 273, 425.
36. Zhou, C., Li, Z., Diao, H., Yu, Y., *et al.*, (2006) DNA damage evaluated by gammaH2AX foci formation by a selective group of chemical/physical stressors. *Mutat. Res.*, 604, 8-18.
37. Azqueta, A. Arbillaga, L., Lopez de Cerain, A., Collins, A., (2013) Enhancing the sensitivity of the comet assay as a genotoxicity test, by combining it with bacterial repair enzyme FPG. *Mutagenesis*, 28, 271-277.

Figure legends

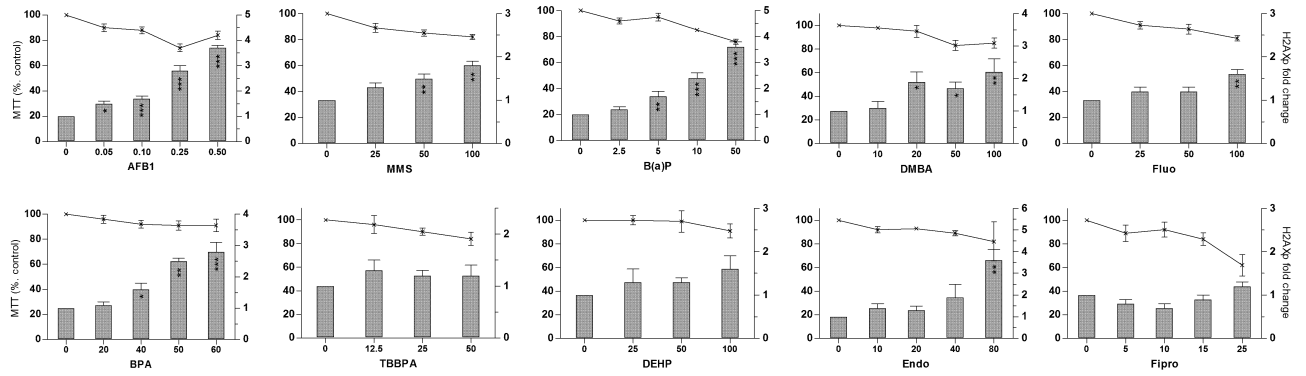
Table 1: Comparison of cytotoxicity IC_{50} (μM) after 1, 7 and 14 days of treatment by the ten selected compounds in HepaRG hepatocyte-like cells. HepaRG cells were treated with a wide range of concentrations for the 10 selected compounds (Supplementary data 1) during 1, 7 or 14 days. The toxicity was evaluated by MTT assay and $IC_{50} \pm SEM$ was determined using the data from 3 independent experiments.

Figure 1: MTT assay and detection of phospho-histone H2AX in HepaRG cells treated with low doses of environmental contaminants. HepaRG cells were treated with the indicated concentrations of contaminants for 1, 7 or 14 days. The toxicity was evaluated by MTT assay and the genotoxicity was measured using automated *in situ* detection of γ H2AX positive cells. The control value was arbitrarily set at 1 and results were expressed as relative to control. Bars represent the average of at least 3 independent experiments (S.E.M.). Statistics were realized using Student's *t*-test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

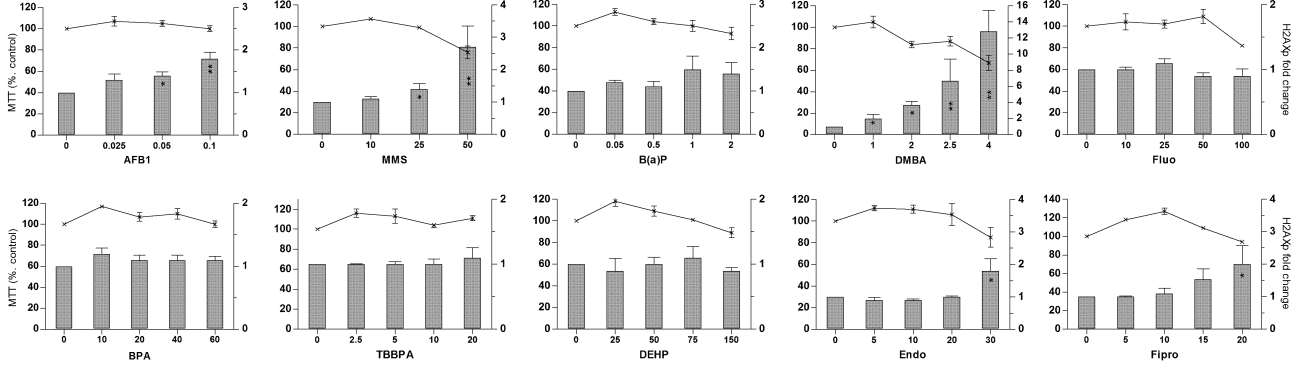
Table 2: Fold induction of γ -H2AX fluorescence and micronucleus after 1 and 7 days of treatment with contaminants. The results are expressed as the fold induction of MNMN (Micro-mononucleated) and γ H2AX fluorescence in treated cultures compared to control cultures. Values represent the average of 3 independent experiments (\pm S.E.M). * $P < 0.05$ versus control using Student's *t*-test.

Table 3: In vitro genotoxicity data obtained for the environmental contaminants in various cell models. When available, the results in human hepatic cells are presented. Conc. used: the range of concentrations used the study. Time is the period of treatment and effective conc. is the lowest concentration inducing a significant change in the genotoxicity assay. Ref. : refrence of the publication. BNMN: Binucleated micronucleated cells, MNMN: micro-mononucleated cells.

1 day of treatment



7 days of treatment



14 days of treatment

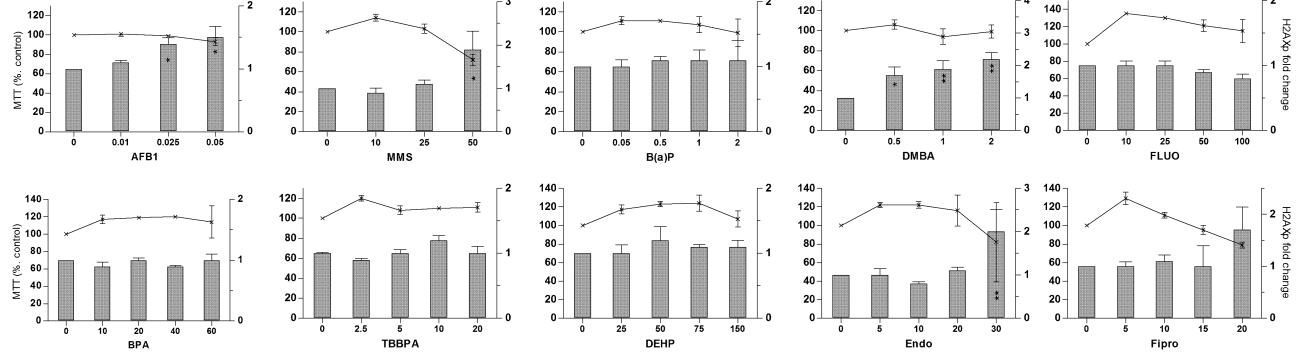


Figure 1: Quesnot et al.

IC50 \pm SEM	AFB1	B[a]P	BPA	DMBA	Endo	Fluo	Fipro	MMS	TBBPA
Day 1	1.8 \pm 0.2	355 \pm 15	108 \pm 5	292 \pm 27	109 \pm 4	217 \pm 40	118 \pm 22	240 \pm 15	86 \pm 6
Day 7	0.4 \pm 0.1	10 \pm 2	87 \pm 2	12 \pm 3.5	57 \pm 4	257 \pm 31	32 \pm 2	277 \pm 5	38 \pm 3
Day 14	0.1 \pm 0.05	7 \pm 2	89 \pm 2	6 \pm 0.5	8 \pm 4	233 \pm 32	33 \pm 3	197 \pm 33	25 \pm 5

Table 1 : Quesnot et al.

Treatment duration (days)	AFB1				B[a]P				BPA				Fipronil				DMBA			
	1		7		1		7		1		7		1		7		1		7	
Dose μ M	0.25	0.5	0.05	0.1	5	10	0.5	1	40	60	40	60	15	25	15	20	50	100	2	2.5
Phospho- γ -H2AX	2.8*	3.7*	1.4*	1.8*	1.7*	2.4*	1.1	1.5	1.6*	2.8*	1.1	1.1	0.8	1.2	1.5	2.0*	1.7*	2.2*	3.7*	6.7*
	\pm 0.20	\pm 0.10	\pm 0.09	\pm 0.15	\pm 0.20	\pm 0.20	\pm 0.12	\pm 0.31	\pm 0.20	\pm 0.30	\pm 0.08	\pm 0.06	\pm 0.10	\pm 0.10	\pm 0.32	\pm 0.57	\pm 0.2	\pm 0.4	\pm 0.46	\pm 2.71
Micronucleus	9.16*	11.89*	4.06*	4.44*	1.90*	4.43*	2.49*	3.19*	2.00	1.52	1.33	1.47	1.54	1.68	2.20*	1.88*	>10	>10	1.82*	3.50*
	\pm 1.57	\pm 1.41	\pm 0.44	\pm 0.66	\pm 0.1	\pm 1.57	\pm 0.84	\pm 0.29	\pm 0.79	\pm 0.05	\pm 0.64	\pm 0.72	\pm 0.24	\pm 0.44	\pm 0.26	\pm 0.5	ND	ND	\pm 0.62	\pm 1.11

Table 2 : Quesnot et al.

	Cells	Conc. used	Time (hours/days)	Assays	Parameter	Effective Conc.	Ref.
B(a)P	HepG2	0.001-1 μ M	24 hours	H2AX	Positive cells	0.1 μ M	9, 30
	HepaRG	5-250 μ M		Comet	% DNA in tail	50 μ M	17
		0.25-2.5 μ M		Micronucleus	BNMN	0.25 μ M	17
		0.05-0.1 μ M	1-14 days	H2AX	Positive cells	5-50 μ M	Quesnot et al.
DMBA	HepG2	0.001-1 μ M	24 hours	H2AX	Positive cells	0.01 μ M	9, 30
		0.3-0.6 μ M		Micronucleus	MNMN	0.3 μ M	30
	HepaRG	0.5-100 μ M	1-14 days	H2AX	Positive cells	0.5-4 μ M	Quesnot et al.
Fluo	HepG2	0.01-10 μ M	24 hours	H2AX	Positive cells	No effect	9
	HepaRG	10-100 μ M	1-14 days	H2AX	Positive cells	100 μ M	Quesnot et al.
Fipro	PBMC	0.2-1.6 μ M	72 hours	Comet	Visual scoring	0.2 μ M	25
				Micronucleus	BNMN	1.6 μ M	
	HepaRG	5-25 μ M	1-14 days	H2AX	Positive cells	20 μ M	Quesnot et al.
Endo	HepG2	50-1000 μ M	48 hours	Micronucleus	MNMN	50-1000 μ M	29
				Comet	Tail length	200 μ M	
	HepaRG	5-80 μ M	1-14 days	H2AX	Positive cells	30 μ M	Quesnot et al.
TBBPA	No data available <i>in vitro</i> on human cells						
BPA	HepG2	1-100 μ M	24 hours	H2AX	Positive cells	No effect	8
	MCF-7	0.01-100 μ M	24 hours	Comet	Tail length	1 μ M	33
	HepaRG	0.05-60 μ M	1-14 days	H2AX	Positive cells	40 μ M	Quesnot et al.
DEHP	rat hep.	1-10000 μ M	24 hours	Micronucleus	MNMN	No effect	2, 34
	HepG2	2.5-250 μ M	24-48 hours	Comet	Tail moment	2.5 μ M	27
	LNCaP cells	1-10000 μ M	24 hours	Comet	% DNA in tail	3000 μ M	35
AFB1	HepaRG	1-2.5 μ M	24 hours	Comet	% DNA in tail	2.5 μ M	17
		0.25-2.5 μ M		Micronucleus	BNMN	0.25 μ M	17
		0,05-1 μ M		Micronucleus	MNMN	0.1 μ M	18
	HepG2	1 μ M	12-24 hours	H2AX	Positive cells	1 μ M	24, 28
	HepaRG	0.01-0.5 μ M	1-14 days	H2AX	Positive cells	0.025 μ M	Quesnot et al.
MMS	FL cells	1-100 μ M	24 hours	H2AX	Positive cells	10 μ M	36
	TK6 cells	4.5-70 μ M	24 hours	Comet	% DNA in tail	36 μ M	37
	HepaRG	45-240 μ M	24 hours	Micronucleus	MNMN	90 μ M	18
		10-100 μ M	1-14 days	H2AX	Positive cells	2 μ M	Quesnot et al.

Table 3 : Quesnot et al.

Supplementary data 1

Environmental contaminants and concentrations used for the treatments of HepaRG cells.

Aflatoxin B1 (AFB1): This mycotoxin is a major indirect hepatogenotoxic components through its exo-8,9 epoxide metabolite formed by its CYP3A4-dependent metabolism. Since a large body of evidences established its genotoxicity, AFB1 was used as positive control. Concentrations used for IC₅₀ determination were 0.02, 0.0625, 0.1, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 and 2.5 μM for acute toxicity (a single exposure for 24 h) and for chronic toxicity 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.25 and 0.5 μM . Genotoxicity was assayed with the concentrations of 0.05, 0.1, 0.25 and 0.5 μM at day 1, the concentrations of 0.025, 0.05 and 0.1 μM at day 7, and the concentrations of 0.01, 0.025 and 0.05 μM at day 14.

Methyl methane sulfonate (MMS): Methyl methane sulfonate is an alkylating agent and it is reasonably anticipated to be a human carcinogen based on sufficient evidence of carcinogenicity from studies in experimental animals. MMS methylates DNA predominantly on N7-deoxyguanosine and N3-deoxyadenosine, and to a much lesser extent also methylates at other oxygen and nitrogen atoms in DNA bases, and also methylates the phosphodiester linkage. This mode of action probably involves direct double-stranded DNA breaks since homologous recombination deficient cells are particularly vulnerable to the effects of MMS. However, MMS would also stall replication fork (Lundin C, North M, Erixon K, Walters K, Jenssen D, Goldman ASH and Helleday T (2005) Methyl methane sulfonate produces heat-labile DNA damage but no detectable *in vivo* DNA double strand breaks. Nucleic Acids Research, 33, 3799-3811). This compound also serves as a positive control for direct genotoxicity. Concentrations used for IC₅₀ determination were 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, and 150 μM for acute toxicity (a single exposure for 24 h) and for chronic toxicity 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 and 25 μM . Genotoxicity was assayed with the concentrations of 25, 50, and 100 μM at day 1, the concentrations of 10, 25 and 50 μM at days 7 and 14.

Benzo(a)pyrene [B(a)P]: B(a)P is a polycyclic aromatic hydrocarbon that binds to the aryl hydrocarbon receptor and translocates to the nucleus to induce expression of phase I enzymes including the CYP1A1. B(a)P is a genotoxic via its metabolism by the CYP1A1 and 1B1 into various metabolites down to the ultimate toxic compound, benzo[*a*]pyrene -7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide. B(a)P is found in coal tar, automobile exhaust fumes, all smoke resulting from combustion of organic

material and in charbroiled food. Concentrations used for IC₅₀ determination were 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 200, 300 and 400 μM for acute toxicity (a single exposure for 24 h) and for chronic toxicity 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 and 25 μM . Genotoxicity was assayed with the concentrations of 2.5, 5, 10 and 50 μM at day 1, the concentrations of 0.05, 0.5, 1 and 2 μM at days 7 and 14.

7, 12-dimethylbenzanthracene (DMBA): is a powerful immunosuppressor/immunotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon. DMBA is widely used in research laboratories as a tumor initiator in animals. It is genotoxic though its metabolism by the CYP1B1. Concentrations used for IC₅₀ determination were 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 150, 200 and 300 μM for acute toxicity (a single exposure for 24 h) and for chronic toxicity 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 and 2.5 μM . Genotoxicity was assayed with the concentrations of 10, 20, 50 and 100 μM at day 1, the concentrations of 1, 2, 2.5 and 4 μM at day 7 and the concentrations of 0.5, 1, and 2 μM at day 14.

Endosulfan (Endo): is an organochlorine insecticide and acaricide. It is also an endocrine disruptor and is highly toxic. Banned in more than 50 countries including the European Union and several Asian and West African nations, it is however still extensively used in many countries such as India and China. It induces the CYP3A4. Concentrations used for IC₅₀ determination were 1, 5, 10, 25, 50, 100, 125 and 150 μM for acute toxicity (a single exposure for 24 h) and for chronic toxicity 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 and 25 μM . Genotoxicity was assayed with the concentrations of 10, 20, 40 and 80 μM at day 1, the concentrations of 5, 10, 20 and 30 μM at days 7 and 14.

Fluoranthene (Fluo): is a polycyclic aromatic hydrocarbon that does not bind to the aryl hydrocarbon receptor. It is found in many combustion products and has a moderate genotoxicity. Concentrations used for IC₅₀ determination were 1, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 and 350 μM for acute toxicity (a single exposure for 24 h) and for chronic toxicity 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 and 2.5 μM . Genotoxicity was assayed with the concentrations of 25, 50 and 100 μM at day 1, the concentrations of 10, 25, 50 and 100 μM at days 7 and 14.

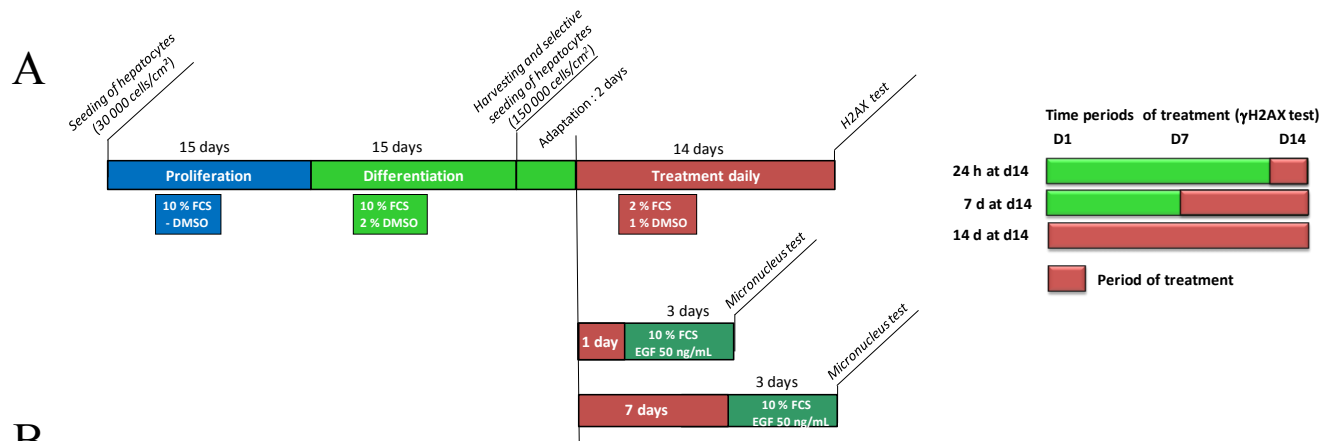
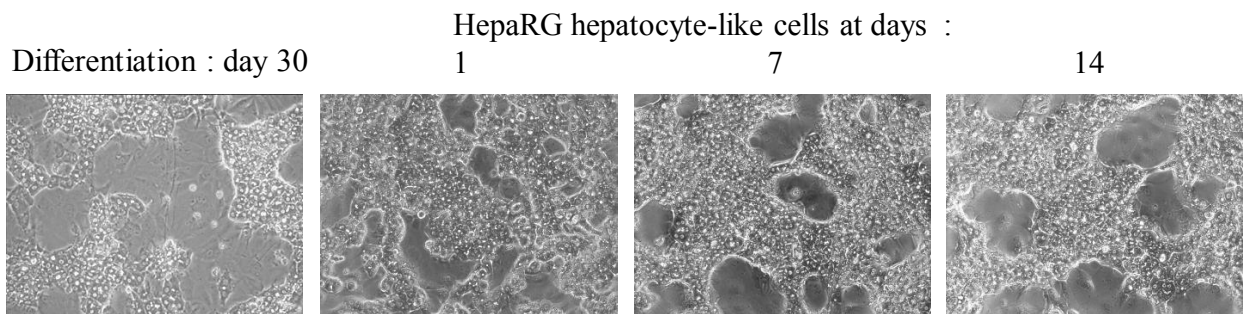
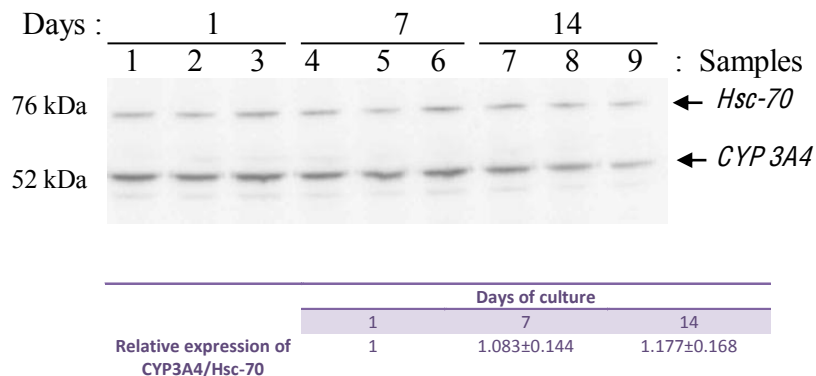
Bisphenol A (BPA): a known environmental estrogen produced on very large scale worldwide for which convincing evidences of human exposure have been collected. It is well-established that BPA generates developmental and reproductive toxicity in laboratory animals at low dose compatible with environmental concentrations. Its toxicity includes adverse effects on fertility and reproduction and

prostate tissue in offspring of exposed animals. Concentrations used for IC₅₀ determination were 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 and 350 µM for acute toxicity (a single exposure for 24 h) and for chronic toxicity 5, 10, 20, 50, 80 and 115 µM. Genotoxicity was assayed with the concentrations of 20, 40, 50 and 60 µM at day 1, the concentrations of 10, 20, 40 and 60 µM at days 7 and 14.

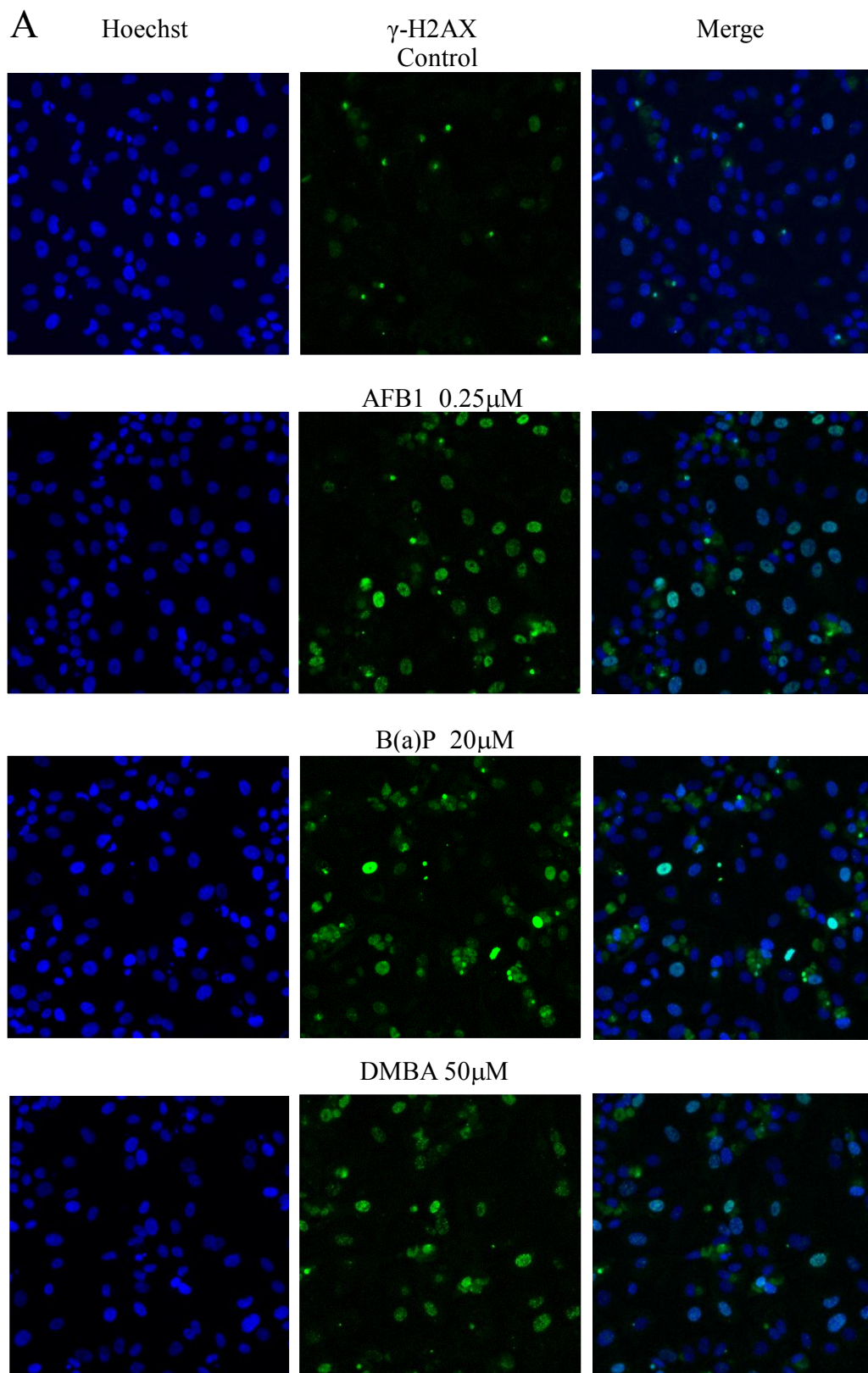
Tetrabromo-bisphenol A (TBBPA): TBBPA is a brominated flame retardant produced in considerable amounts. It is mainly used as a polymerized flame retardant in the manufacturing of epoxy resins. It can, however, leak from synthetic materials and it is clearly present in the environment and in human plasma samples living in contaminated environment. TBBPA could possibly interfere with thyroid hormone receptors. Concentrations used for IC₅₀ determination were 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 and 70 µM for acute toxicity (a single exposure for 24 h) and for chronic toxicity 10, 20, 30, 40, 50, 55 and 60 µM. Genotoxicity was assayed with the concentrations of 12.5, 25 and 50 µM at day 1, the concentrations of 2.5, 5, 10 and 20 µM at days 7 and 14.

Di(2-ethylhexyl)phtalate (DEHP): High molecular weight phtalates including DEHP are primarily used as plasticizers. They are, however, not bound to polymerized plastic and can leak or evaporate into indoor air or food supplies. Humans are exposed through ingestion, inhalation and dermal exposure during their whole life, including during intrauterine development. Phtalates exert a broad range of effects on reproductive development. Effects of DEHP would appear to be mediated by PPARs and AR. Concentrations used for IC₅₀ determination were 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 and 600 µM for acute toxicity (a single exposure for 24 h) and for chronic toxicity 100, 150, 200, 250, 300, 350 and 400 µM. Genotoxicity was assayed with the concentrations of 25, 50 and 100 µM at day 1, the concentrations of 25, 50, 75 and 150 µM at days 7 and 14.

Fipronil (Fipro): Fipro is a phenylpyrazole class insecticide used to control a variety of crop and veterinary pests. It is a potent disruptor of the GABA receptor system with concerns about its environmental and human health effects. Its use has already been restricted in countries for possible toxic impact on bees. Fipro and its fipronil sulfone metabolite are known to be hepatotoxic and significantly enhance the CYP1A1 and 3A4. Concentrations used for IC₅₀ determination were 1, 2.5, 5, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 and 60 µM for acute toxicity (a single exposure for 24 h) and for chronic toxicity 0.125, 2, 5, 10, 20, 25 and 35 µM. Genotoxicity was assayed with the concentrations of 5, 10, 15 and 25 µM at day 1, the concentrations of 5, 10, 15 and 20 µM at days 7 and 14.

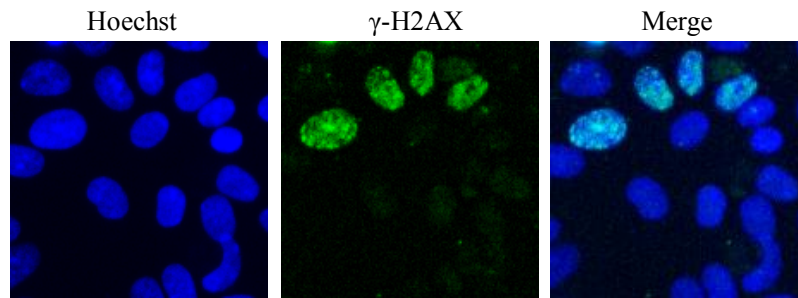
**B****C**

Supplementary data 2 : A) Schematic representation of the culture conditions and procedures of treatment of HepaRG cells B) Morphology of HepaRG cells in phase contrast microscopy at day 30 after the process of differentiation and after 1, 7 or 14 days in the culture conditions used for the treatments with contaminants. Three samples at each time points are presented (samples 1, 2 and 3 at day 1, 4, 5 and 6 at day 7 and 7, 8 and 9 at day 14). Densitometry analysis of the CYP3A4 versus the loading control Hsc70 is presented in the chart of the lowest panel, C) Immunoblotting of the CYP3A4 and Hsc 70 (loading control) in three independent cultures showing the stability of the differentiation status of HepaRG cells and their metabolic ability over the 14 days of the treatment time.



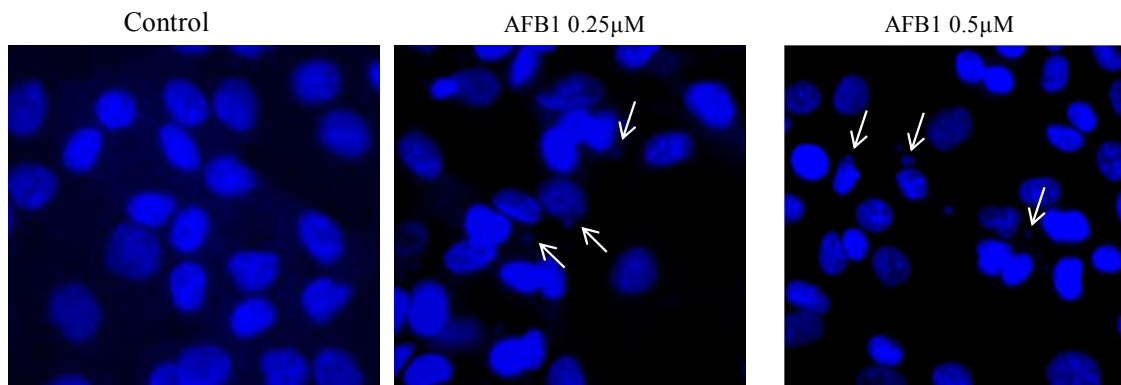
Supplementary data 3 : A) Visualization of γ -H2AX positive HepaRG cells using the CellomicsArray Scan HCS Reader. Hoechst 33342 (blue), γ -H2AX (green), and merge stainings in control and contaminant treated (AFB1 : 0.25mM ; B(a)P : 20mM ; DMBA : 2.5mM) HepaRG cells. Bar : 100 mm.

B



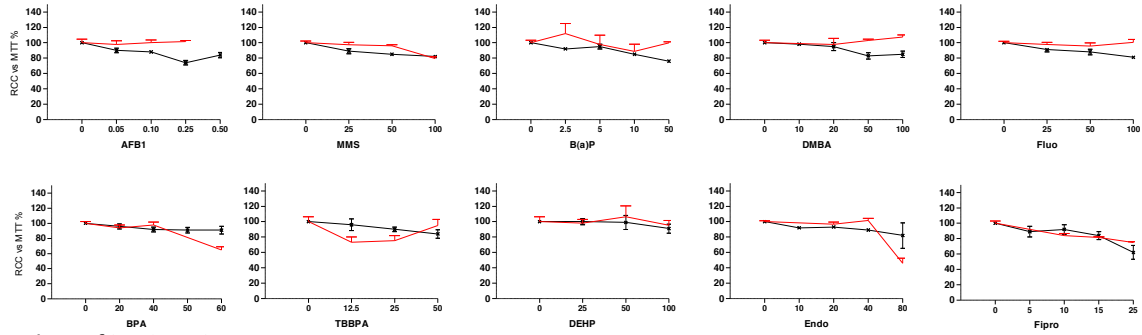
Supplementary data 3 : B) Visualization of γ -H2AX positive cells in HepaRG treated cultures using the Array Scan Cellomics imager system. High magnification in AFB1 (0.25 μ M) treated HepaRG cells. Bar : 30 μ m.

C

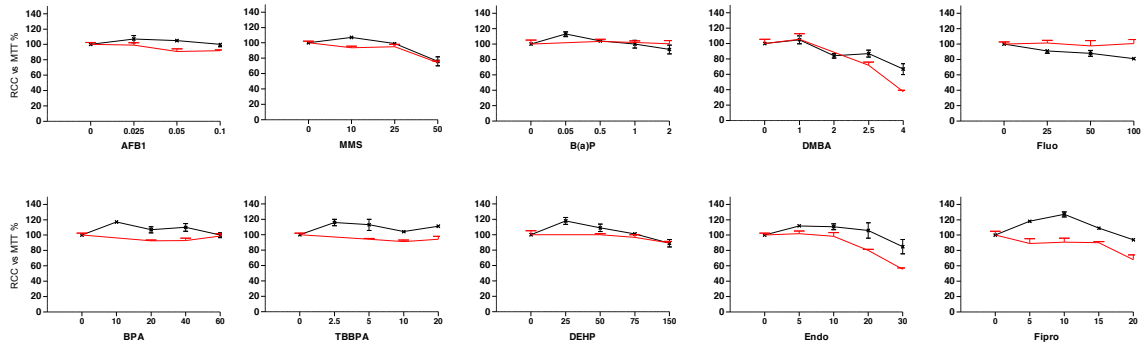


Supplementary data 3 : C) Visualization of micronuclei (white arrows) in control and AFB1-treated HepaRG cells. Bar : 30 μ m.

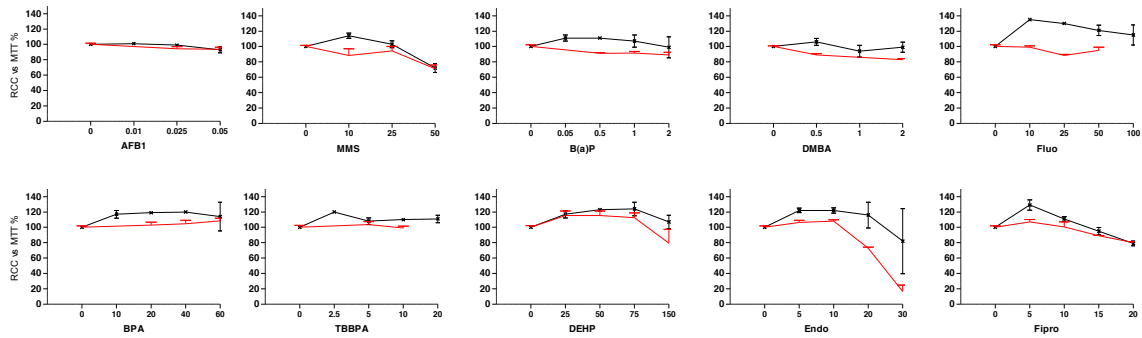
1 day of treatment



7 days of treatment



14 days of treatment



Supplementary data 4: Comparison of cytotoxicity measured with MTT (black line) and RCC (red line) for the 10 environmental contaminants at days 1, 7 and 14.

3. Article 2

HepaRG cell-based biosensors for rapid detection of cytochrome P450 1A1, 2B6, 3A4 and GSTA1 transcriptional inductions by xenobiotics

Nicolas QUESNOT, Kathleen JARNOUEN, Catherine RIBAUT, Claudine RAUCH, Elise VENE,
Hélène DUBOIS-POT-SCHNEIDER, Anne CORLU, Fabrice MOREL, Marie-Anne ROBIN,
Pascal LOYER

INSERM, UMR991, Liver, Metabolisms and Cancer, CHU Pontchaillou, F-35033 Rennes;
Université de Rennes 1, F-35043 Rennes

Cet article est actuellement en préparation

TITLE:

HepaRG cell-based biosensors for rapid detection of cytochrome P450 1A1, 2B6, 3A4 and GSTA1 transcriptional inductions by xenobiotics.

Nicolas QUESNOT, Kathleen JARNOUEN, Catherine RIBAUT, Claudine RAUCH, Elise VENE, Hélène DUBOIS-POT-SCHNEIDER, Anne CORLU, Fabrice MOREL, Marie-Anne ROBIN, Pascal LOYER*

INSERM, UMR991, Liver, Metabolisms and Cancer, CHU Pontchaillou, F-35033 Rennes;
Université de Rennes 1, F-35043 Rennes

*CORRESPONDING AUTHOR: LOYER Pascal, UMR 991, Liver, Metabolisms and Cancer, CHU Pontchaillou, F-35043 Rennes, France. Phone: 0033 (0)223233870, Fax: 0033 (0)299540137, e-mail: pascal.loyer@univ-rennes1.fr

KEYWORDS : drug screening, HepaRG cells, cell-based biosensors, cytochromes P450

ABBREVIATIONS: CYP450: cytochrome P450; DMSO: dimethyl sulfoxide ; XMEs: xenobiotic-metabolizing enzymes ;

ABSTRACT

In the assessment of drug hepatotoxicity, the induction of DME's expression by xenobiotics is crucial to evidence activation of metabolic pathways. The human HepaRG express most of the major phase I, II and III enzymes and provide a valuable *in vitro* alternative model to primary culture of hepatocytes for studying drug metabolism and toxicity. Here, we report the establishment of new biosensor HepaRG cells stably transduced with lentiviruses encoding the reporter green fluorescent protein (GFP) under the transcriptional control of the promoters of the CYP1A1, CYP2B6, CYP3A4 and GSTA1. We showed that these biosensor transgenes containing DME promoters driving the GFP expression and the corresponding endogenous DME genes shared similar transcriptional regulation during the process of proliferation and differentiation in the HepaRG cells. We also demonstrated that the biosensor transgenes are induced by prototypical drug inducers while a control HepaRG cell line expressing the GFP under a cytomegalovirus (CMV) promoter show no variation in GFP expression after treatment with the same drugs. Despite weaker GFP transcriptional inductions by the xenobiotics compared to the corresponding endogenous genes, our work demonstrates the sensitivity and specificity of these biosensor cells with potential applications in the field of chemicals safety evaluation.

1. Introduction

The liver plays a crucial role in the biotransformation of xenobiotics since the adult hepatocytes express a wide panel of drug metabolizing enzymes [Guillouzo and Guguen-Guillouzo, 2008]. Normal hepatocytes perform many biochemical reactions including the detoxication of endogenous toxins and xenobiotics via the catalytic activities of phase I, II and III drug metabolism enzymes (DMEs). As such, the liver is also a main target of toxic xenobiotics and their down-stream reactive metabolites as demonstrated by the fact that the most frequent cause for the market withdrawals of approved medications is hepatotoxicity evidenced by the pharmacovigilance agencies [Lasser et al., 2002].

The assessment of drug metabolism and toxicity is a complex, expensive and time consuming process that relies on the use of both *in vitro* cell systems [Suter, 2006] and *in vivo* animal models prior to clinical trials in Humans. Among the *in vitro* cell systems, human primary hepatocytes are recognized as the most pertinent cells for accurately predicting xenobiotic metabolism and DME induction and hepatotoxicity by synthetic compounds [Guillouzo and Guguen-Guillouzo, 2008]. However, large variations in functional activities especially for cytochrome P450 enzymes (CYP) have been observed in human hepatocytes isolated from different donors [Guillouzo and Guguen-Guillouzo, 2008]. In addition, the relative shortage and unpredictable availability of human biopsies along with the limited growth and lifespan of hepatocytes in primary cultures limit considerably the use of these models.

The hepatoma cell lines are an attracting alternative to the use of primary human hepatocytes for toxicity [Suter, 2006] and genotoxicity studies [Audebert et al., 2010], however, these cell lines express limited amounts of DMEs compared to primary hepatocytes [Guillouzo and Guguen-Guillouzo, 2008, Wilkening et al., 2003]. To circumvent this drawback, highly selected subclones of hepatoma cells such as the HepG2C3A expressing higher amounts of CYP have been derived [Kelly, 1994] and recombinant derived hepatoma cell lines have been

generated through stable transfection of expression vectors encoding DMEs [Hashizume et al., 2010] or liver specific transcription factors driving transcription of DME genes [Jover et al., 1998]. Most hepatoma cell lines show, however, reduced expression levels of DMEs and limited induction upon treatments with the canonical xenobiotic inducers.

Undifferentiated human HepaRG cells are bipotent hepatic progenitors with high proliferation potential and capable to differentiate into biliary and hepatocyte-like cells [Gripon et al., 2002]. This recently established cell model represents a unique *in vitro* cell system to investigate the molecular signalling pathways controlling the hepatocyte differentiation [Cerec et al., 2007 ; Dubois-Pot-Schneider et al., 2014]. Moreover, HepaRG hepatocyte-like cells that express most of the major phase I, II and III enzymes [Aninat et al., 2006] provide a valuable *in vitro* alternative model to primary culture of hepatocytes now used worldwide for studying drug metabolism [Aninat et al., 2006 ; Dumont et al., 2010 ; Legendre et al., 2009] and toxicity [Jossé et al., 2008 ; Pernelle et al., 2011] and genotoxicity of xenobiotics [Jetten et al., 2013 ; Quesnot et al., 2015].

In the assessment of drug hepatotoxicity, an important aspect is the induction of DME's expression by xenobiotics in order to evidence activation of metabolic pathways. Beyond the study of the drug metabolisms, the expression of DMEs in hepatocytes is also strongly regulated by endogenous noxious compounds, hormonal factors such as growth factors and cytokines [Abdel Razzak et al., 1993 ; Langouet et al., 1995] and hypoxia [Legendre et al., 2009]. In order to study the regulation of DME expression, the mRNA and/or protein levels must be measured and, when an assay is available, the quantification of their enzymatic activity is performed. These experiments require relatively large amounts of cells, cell extracts and/or purification of specific molecular species and are labour intensive. To overcome these problems rapid high-throughput cell-based assays that measure cell responses and gene induction are being developed to provide early warning on metabolic pathway

activations and toxicity. Among these assays, whole cell biosensors in HepaRG [Pernelle et al. 2011 ; Tsuji et al., 2014] and HepG2 [Casabar et al., 2010 ; Blagus et al., 2014 ; Tsuji et al., 2014] hepatoma cell lines have been developed in order to detect mitochondrial dysfunction, toxicity, metabolism and genotoxicity.

In the present study, we describe the development and validation of whole cell-based biosensor systems that is based on the human hepatoma HepaRG cells that were either transiently transfected or stably transduced with lentiviral transgenes containing DME partial gene promoters of CYP1A1, 2B6 and 3A4 and GSTA1 driving the transcription of the reporter genes. Plasmid constructions containing the firefly luciferase gene reporter under the transcriptional control of all or part of the promoter region of the 3 CYPs and the GSTA1 were transiently co-transfected with Renilla luciferase gene in differentiated HepaRG cells. Biosensors were first challenged during 24h treatments with prototypical inducers of each transfected XME promoters, i.e. benzo[a]pyrene for CYP1A1, phenobarbital for CYP2B6, rifampicin for CYP3A4 and oltipraz for GST to assess their specificity. Then, the effects of widespread contaminants such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) (7,12-dimethylbenzanthracene, fluoranthene) aflatoxin B1, endosulfan, fipronil, tetrabromobisphenol A, and plasticizers (Bisphenol A, di(2-ethylhexyl)phthalate) on luciferase activity were tested. The transient transfection experiments demonstrated that the biosensor constructs properly induced the expression of luciferase following treatments with DME prototypical DME inducers and some of the environmental contaminants. The promoter sequences of the DME genes were then subcloned into the lentiviral backbone pLV-GFP plasmid containing green fluorescence protein (GFP) coding sequence. Lentiviruses were produced and used to derive stably transduced recombinant HepaRG cells that were also evaluated for the induction of GFP fluorescence signal following treatments with canonical xenobiotic inducers of DMEs and the environmental pollutants.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

The environmental contaminants and prototypical inducers Aflatoxin B₁ (AFB₁), benzo[a]pyrene (B[a]P), bisphenol A (BPA), diethylhexyl phthalate (DEHP), 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA), endosufan (Endo), fipronil (Fipro), fluoranthene (Fluo), methyl methanesulfonate (MMS), tetrabromobisphenol A (TBBPA), rifampicine (RIF), oltipraz (OTZ) and insulin were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). Phenobarbital was provided by Sanofi-Aventis (Gardenal). William's E medium was purchased from Eurobio (Les Ulis, France). Fetal calf serum (FCS) was obtained from Lonza (Levallois-Perret, France). Penicillin, streptomycin and L-glutamine were purchased by Life Technologies (Saint Aubin, France).

2.2. HepaRG cell culture

The HepaRG cell line is a patented cell line (PCT/FR02/02391 of July 8, 2002) licensed to BIOPREDIC International (<http://www.heparg.com/>). The HepaRG cells were seeded at a density of 3×10^4 cells/cm² and cultured in William's E medium supplemented with 10% of FCS, 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, 5 µg/mL insulin, 2mM L-glutamine and 50 µM hydrocortisone hemisuccinate. After 2 weeks, cells were cultured in the same medium supplemented with 2% dimethylsulfoxide (DMSO) for two more weeks prior to selective trypsination and seeding of hepatocytes-like cells at a density of 1.6×10^5 cells/cm². For toxicity assays, cells were exposed daily to contaminants according to the protocol. William's E medium was supplemented with 2% FCS and 1% DMSO for acute and chronic treatments.

2.3. Luciferase and GFP reporter gene constructs.

DNA fragment corresponding to the 5' flanking region of the hCYP1A1 gene (-1679/+80), 1679 bp upstream of exon 1), the CYP2B6 (-1995/+1), the CYP3A4 distal (-7600/-7200) and the hGSTA1 gene (-1932/+1, 1932 bp upstream of exon 1) were cloned into the pGL3 basic vector (Promega) and the lentiviral expression vector pLV-GFP upstream of the firefly luciferase and the GFP reporter genes, respectively. Others constructs, the 5'-flanking region upstream of the CYP3A4 proximal (-1100/+11 into pGL3-basic) and the 3XRE (XRE consensus sequence of 41 bp into pGL3-promoter) were cloned into the pGL3 only, while the combined CYP3A4 distal + proximal chimeric promoter was cloned into the lentiviral expression vector pLV-GFP. The CYP3A4 promoters have been previously described [Piton et al., 2010 ; Legendre et al., 2009 ; Ayed-Boussema et al., 2011].

2.4. Electroporation, treatments with xenobiotics and luciferase assay.

Plasmid DNAs were purified on Nucleobond ® Xtra Midi (Macherey-Nagel) and quantified by optical density 260 nm. After selective isolation, cells were co-transfected by electroporation with control vector (pRL SV40, 50ng/10⁵ cells) and the vectors containing firefly luciferase under the control of XME promoters (pGL3-XMEprom 300ng/10⁵ cells). The promoterless pGL3-luciferase construct was also transfected providing negative firefly luciferase controls. Electroporation was performed using Microporator MP-100 (Digital Bio) as previously described [Laurent et al 2010] with the following parameters: one pulse of 1500V, during 20ms. Then, the cells were seeding at 2.5x10⁵ cells/cm² in 48 wells plate. After 24h, cells cultured in William's E medium without DMSO and FCS were treated with xenobiotics and environmental contaminants dissolved in DMSO (0.25% final concentration of DMSO in medium) during 24h prior to luciferase assay (Dual-Glo Luciferase Assay system, Promega). This assay was performed using the manufacturer's instruction and

luciferase activities were measured with a luminometer (Centro XS3 LB960, Berthold Technologies).

2.5. Production of lentivirus, infection and selection of stable HepaRG recombinant cells.

The DME promoter sequences were inserted in the lentiviral expression plasmid vector pLV-GFP. The lentiviral production was performed in HEK293T cells by Vectalys (Toulouse, France). Infections were performed using proliferating progenitor HepaRG cells in 24 well plates with a Multiplicity Of Infection of 5 at day 1 after splitting the cells. Two weeks later, GFP positive cells were sorted by flow cytometry prior to cell expansion and freezing.

2.6. Western blotting

After removal of culture medium, adherent cells were washed once with cold PBS and lysed in 50 mM HEPES pH 7.9, 150 mM, NaCl, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 0.5% Tween 20 supplemented with protease inhibitors (EDTAfree, Roche). Protein content in cell lysates were quantified using Bradford assay and 20 µg of proteins were resolved on NuPAGE® Novex® Bis-Tris 4-12% gels kit (Invitrogen), transferred to PVDF membranes (Trans-blot® Turbo™ Transfer System, Biorad) and analyzed using chemiluminescence detection (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate). Western blot was performed using the following antibodies : the CYP3A4 (AB1254, Chemicon), the CYP2E1 (Oxford Biomedical, USA) and the HSC70 (B-6, sc7298, Santa Cruz Biotechnology), GFP (mAb 8758, Abnova), GST, CYP1A1, CYP2B6, Albumin (1140V7, Kent laboratories).

2.7. RetroTranscription quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

RNA were extracted with (SV total RNA isolation System, Promega, Madison,WI). Reverse transcription was performed using High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied

Biosystems, foster city). Quantification of mRNA levels of various genes was performed using Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) on ABI PRISM 7900HT instrument. GAPDH was used as a housekeeping gene

2.8. Flow cytometry analysis

The cell monolayers were washed with PBS before the observation by fluorescence microscopy (Zeiss Inverted Microscope, Analysis Software AxioVision). Then the cells were detached with trypsin and analyzed by flow cytometry (FACSCalibur Becton Dickinson) to quantify the fluorescence (Channel FL1H) emitted by the GFP positive cells. Cytometry data were analyzed using CellQuest software (Becton Dickinson).

3. Results and discussion

3.1. Expression of phase I and II DMEs during differentiation of HepaRG hepatocyte-like cells.

In order to be properly cultured, the HepaRG cells are routinely expanded over 2 weeks between two passages (Figure 1A). It is well established that HepaRG cells actively proliferate during the first 8 to 10 days after splitting [Gripon et al., 2002 ; Cerec et al., 2007 ; Dubois-Pot-Schneider et al., 2014] as confirmed by the cell counts and the high numbers of cells in S and G2/M phases during this period (Figure 1B). Then, the proliferation activity strongly decreases and over 95% of cells are arrested in G0/G1 two weeks after cell splitting. Two weeks after cell seeding, nearly 50% of quiescent HepaRG cells have committed toward hepatocyte-like cell lineage as previously demonstrated [Gripon et al., 2002 ; Cerec et al., 2007 ; Dubois-Pot-Schneider et al., 2014] and confirmed by the albumin expression detected by western blot (Figure 1C). To further expand these cells, a new cell detachment must be performed at this stage, two weeks after the previous passage.

However, the addition of 2%DMSO to culture medium of committed HepaRG cells allows to further enhance expression of hepatocyte specific functions especially cytochrome P450's [Aninat et al., 2006

; Dubois-Pot-Schneider et al., 2014]. During DMSO treatment, remaining hepatocyte-like cells complete their differentiation and undergo drastic morphological changes to give rise to well-defined colonies of hepatocytes characterized by a dark cytoplasm, a large nucleus with a single nucleolus and functional neo-canaliculi (Figure 1A) while the overall cell number is slightly reduced following DMSO treatment (Figure 1B). Ten days to 2 weeks of DMSO treatment are required to obtain the highest expression of the liver specific functions [Gripon et al., 2002 ; Cerec et al., 2007]. In most reports, the expression of liver specific functions especially DMEs in HepaRG cells has been investigated at the mRNA levels [Dubois-Pot-Schneider et al., 2014] and/or by the quantification of DME's catalytic activities [Aninat et al., 2006]. In our study, we studied the expression of several DME proteins by western blotting during a time-course of 31 days to establish their sequential activation during the first two weeks of expansion and the two weeks of stimulation by DMSO treatment (Figure 1C). The proliferation was correlated with the expression of the cyclin A from day 1 to day 8 after cell seeding. Confluent cells detached by trypsin and seeded at low density (day 0) express high levels of albumin confirming that HepaRG cells are committed to the hepatocyte lineage. The albumin expression was decreased during the active phase of proliferation between days 1 and 8 and increased until day 14. The addition of DMSO to the culture medium did not further enhance its expression. In contrast, transferrin, another plasma protein secreted by the hepatocytes, was barely detectable in proliferating and quiescent HepaRG cells during the first 2 weeks post-seeding. Its expression was induced by the DMSO treatment since at day 31, in absence of DMSO, the transferrin was expressed at very low levels. The GSTA1 and GST Mu were expressed in proliferating cells, their expression increased when cells became quiescent and the treatment by DMSO did not significantly increase their expression levels. In contrast, the expressions of the CYP1A1/2, CYP2E1, CYP3A4 and CYP2B6 were very low levels in quiescent cells at day 14, were undetectable during proliferation and strongly increased in HepaRG hepatocyte-like cells under stimulation by DMSO. Our data confirmed previous reports supporting the concept of commitment in the hepatocyte lineage following an active phase of proliferation, and the full hepatocytic differentiation during the 2-week treatment by DMSO.

3.2. Evaluation of DME's promoter biosensor constructs in transfected HepaRG cells

We next verified whether the expression of endogenous DME genes was enhanced by prototypical inducers in HepaRG cells differentiated in our culture conditions (Figure 2). Cells were treated with benzo[a]pyrene [B(a)P], dimethylbenzanthracene (DMBA), fluoranthene (Fluo), phenobarbital (PB) and rifampicin (Rif) for 24h and the expression of CYP1A1, 2B6, 3A4 and GSTA1 was analyzed by RT-qPCR. The CYP1A1 RNA levels were strongly induced (<100 fold) by [B(a)P], DMBA and Fluo and in a lesser extent by PB while Rif had no significant effect (Figure 2). The expression of CYP2B6 and CYP3A4 showed a 50 and 30-fold increase by PB, respectively, while Rif induced a 4-fold increase in CYP2B6 and a 10-fold increase in CYP3A4. Treatment by DMBA resulted in a 4-fold increase in CYP2B6 mRNA levels while [B(a)P] and Fluo had little effects. The [B(a)P], Fluo and DMBA exhibited a moderate increase in CYP3A4 expression. The endogenous GSTA1 gene expression showed a 2-fold induction by PB only. Together, these data showed that the HepaRG cells differentiated in our culture conditions properly respond to prototypical inducers of DME genes.

We next used the plasmids pGL3-CYP2B6-1995, pGL3-CYP3A4 proximal (p, -1100/+11) and pGL3-CYP3A4 distal (d, -7600/-7200) previously described [Piton et al., 2010 ; Legendre et al., 2009 ; Ayed-Boussema et al., 2011], and designed the plasmids pGL3- hGSTA1 gene (-1932) and pGL3-3XRE (Figure 3) to evaluate the DME's promoter biosensor constructs in differentiated HepaRG cells by transient transfection (Figure 4).

The prototypical inducers [B(a)P], PB, Rif, and oltipraz (OTZ) were used to measure the induction of luciferase activity on their main transcriptional target in the corresponding biosensor cells (Figure 4). [B(a)P]-treated cells showed a 3 to 5-fold induction of the luciferase activities in 3XRE-, CYP1A1- and CYP2B6-Luciferase biosensor cells while PB enhanced only the luciferase activity in CYP2B6 biosensor cells. In addition, Rif increased

the transcription of pGL3-CYP3A4d- (Figure 4) and pGL3-CYP3A4p-luciferase plasmids (H. Dubois-Pot-Schneider and A. Corlu, unpublished results) and OTZ the transcription of pGL3-GSTA1 and GSTA3 (Figure 4).

These data of luciferase activities following treatments by the canonical inducers of DMEs demonstrated that the pGL3-DME promoter plasmids can be used as biosensors for the transcriptional induction of DME genes although the overall induction of the luciferase activity is much weaker than the induction of the corresponding endogenous mRNA levels with the same conditions of stimulation by the xenobiotics (concentrations and time of treatments). In addition, we found that the PB did not induce the transcription of pGL3-CYP3A4d while this compound strongly increased the mRNA levels of the CYP3A4 (Figure 2). This lack of induction may be explained either by the experimental conditions used for the transient transfection or an incomplete CYP3A4 promoter region that no longer supports the transcriptional induction mediated by the PB. In order to address this question, further experiments of transfection will be performed with longer periods of treatment by PB and by modulating the culture conditions of HepaRG cells especially the time of stimulation by DMSO prior to the treatment by PB.

3.3. Screening of environmental contaminants using transient biosensors cells

In a previous work [Quesnot et al., 2015], we developed a high-throughput screening of genotoxicity using automated detection of γ H2AX in metabolically competent HepaRG cells and demonstrated that this assay was suitable for genotoxicity and cytotoxicity screening of ten environmental contaminants including the mycotoxin aflatoxin B1 (AFB1), the alkylating agent methyl methane sulfonate (MMS), the organochlorine insecticide and acaricide endosulfan (Endo), the phenylpyrazole class insecticide fipronil (Fipro), the brominated flame retardant tetrabromo-bisphenol A (TBBPA), three polycyclic aromatic hydrocarbons (PHAs)

[benzo(a)pyrene [B(a)P], dimethylbenzanthracene (DMBA), fluoranthene (Fluo)] and two plasticizers [bisphenol A (BPA) and diethylhexylphthalate (DEHP)].

In the present study, the same environmental contaminants were used to study the pGL3-DME promoter biosensor plasmids in transient transfection experiments of differentiated HepaRG-hepatocyte like cells (Figure 5).

The PAHs induced the pGL3-CYP1A1 biosensor plasmid as expected but also in a lesser extent other promoters including the pGL3-3XRE, -CYP2B6, -CYP3A4d and -GSTA1. The pesticide ENDO, a known inducer of CYP3A4, 2B6 and 1A1 thereby induced the three promoters but also the GSTA1 and GSTA3. Fipronil and DEHP both induced in various extents the pGL3-CYP3A4, -CYP2B6 and -CYP1A1 as well as the pGL3-GSTA1 and -GSTA3 biosensor plasmids. The other compounds, Aflatoxin B1, MMS, BPA and TBBPA showed no significant effects on any of the promoter biosensor plasmids (Figure 5).

Despite quantitative differences in transcriptional inductions between the endogenous DME genes and pGL3-DME promoter biosensor plasmids following treatments by xenobiotics, our data demonstrate that these transcription biosensors transiently transfected in differentiated HepaRG hepatocyte-like cells can be useful to detect the induction of transcription for a panel of DME genes thus providing valuable information on the overall metabolic changes induced by these synthetic compounds.

3.4. Establishment of stable recombinant biosensor HepaRG cells

In order to establish stable recombinant biosensor HepaRG cells that could be used for rapid screenings of DME transcriptional inductions, we subcloned the promoters of the CYP1A1, CYP2B6, CYP3A4d and CYP3A4p+d and GSTA1 in the lentiviral expression plasmid vector pLV-GFP. The lentivirus expression vectors obtained contain the promoters described in Figure 3 driving the transcription of the GFP for allowing the direct *in situ* visualization by

fluorescence microscopy of the transcriptional activities and the quantification of the fluorescence by flow cytometry in live HepaRG cells.

Transductions were performed using proliferating progenitor HepaRG cells. Two weeks later, quiescent HepaRG cells that had committed to the hepatocyte cell lineage and displayed a moderate GFP staining were sorted by flow cytometry in order to select only GFP positive cells (data not shown). After expansion, we studied the expression of the GFP in the 5 HepaRG recombinant cell lines following the 31 days culture protocol described in Figure 1 in order to evaluate the patterns of transcription of the different DME promoter-GFP transgenes. The GFP expression was detected *in situ* by fluorescent microscopy (Figure 6) and by western blotting (Figure 7).

Visualization of the GFP by fluorescent microscopy demonstrated low transcriptional activities of the CYP1A1, CYP2B6, CYP3A4d (Figure 6) and CYP3A4p+d (data not shown) promoters within the integrated lentiviral transgene at day 1 after HepaRG cell seeding. In contrast, the fluorescence was much stronger in prom-GSTA1 HepaRG cells (Figure 6). For all the transgenes, the GFP expression strongly increased at days 14 and 31 and was further enhanced with the stimulation by the DMSO. These data of *in situ* GFP visualization were confirmed by the GFP protein detection by western blot (Figure 7). A time-course analysis of the GFP expression in the promCYP1A1-, CYP2B6-, CYP3A4d- and GSTA1-GFP HepaRG biosensor cells was performed and compared to the expression of the corresponding endogenous DME protein. The immunoblottings showed very similar expression patterns for the GFP and the corresponding endogenous DME (Figure 7) demonstrating that the endogenous DME gene and the corresponding transgene containing the DME promoter driving the GFP expression shared similar transcriptional regulation during the process of proliferation and differentiation in the HepaRG cells.

3.5. Induction of stable recombinant biosensor HepaRG cells by xenobiotics

In preliminary experiments, we evaluated the induction of the stable recombinant biosensor HepaRG cells following treatments with xenobiotics including DMBA, [B(a)P], Fluo, Endo, DEHP Rif, PB and Fipro (Figure 8). Despite weak transcriptional inductions of the GFP expression compared to the induction of luciferase in the transient transfection assays, we showed that these biosensors in differentiated HepaRG hepatocyte-like cells are induced by these xenobiotics while a control HepaRG cell line expressing the GFP under a cytomegalovirus (CMV) promoter show no variation in GFP expression after treatment with the drugs.

Additional experiments will be performed with longer periods of treatment by the xenobiotics and by modulating the culture conditions of HepaRG cells especially the time of stimulation by DMSO prior to the treatments in order to further optimize the promoter transcriptional responses and to validate the procedures to use these biosensor HepaRG cells.

4. Conclusion

The data from the present study show that these new biosensor HepaRG cells stably transduced with the green fluorescent protein reporter gene under the control of different DME's promoters efficiently detects different types of drugs. The main advantages of this whole cell-based biosensor systems are: 1) the use of metabolically competent human cells that allow the detection of most of the indirect-acting compounds without the use of exogenous metabolic activation, and 2) the possible adaptation of direct *in situ* measurements of the fluorescent GFP reporter protein in culture microplates, either by fluorimetry or flow cytometry, which provides easy handling and data acquisition. Our work requires further validations to demonstrate the sensitivity and specificity of these biosensor cells. However,

we believe that these new biosensor HepaRG cells can be a valuable tool with potential applications in the fields of chemicals safety evaluation. In addition, our initial validation of the biosensor HepaRG cells focused on the induction of DME promoters by xenobiotics. We also would like to complete this work by investigating the effects of the hypoxia and pro-inflammatory cytokines known to negatively regulate the expression of the CYPs and GSTs.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) [contract NISTEC ANR-09-CESA-003-002], the Institut National de la santé et de la Recherche Médicale (Inserm, France) and the European Commission FP7 program “LIV-ES” (HEALTH-F5-2008-223317). Nicolas Quesnot received a fellowship from the Région Bretagne and Ligue contre le Cancer, Comité Départemental des Côtes d’Armor (22). We would like to deeply thank Dr. Jean-Marc Pascussi (CNRS/INSERM/UM1/UM2-UMR 5203-U661, Montpellier, France) for providing us the CYP3A4 promoter sequences used to generate the corresponding biosensor plasmid constructs. We also thank the Vectalys Company (Toulouse, France) for the subcloning in lentiviral expression vectors and the production of lentivirus infectious particles.

The authors would like to dedicate this article to Drs Marie-Anne Robin and Fabrice Morel who passed away during the preparation of the manuscript. Our colleagues were exceptional

scientists and friends whose enthusiasm for life and belief in science will continue to inspire all of us who were privileged to know them.

References

Abdel-Razzak, Z., Loyer, P., Fautrel, A., Gautier, J.C., Corcos, L., Turlin, B., Beaune, P., Guillouzo, A. Cytokines down-regulate major cytochrome P450 in primary culture of human hepatocytes. *Mol Pharmacol*, 1993, 44, 707-715

Aninat, C., Piton, A., Glaise, D., Le Charpentier, T., Langouet, S., Morel, F., Guguen-Guillouzo, C., and Guillouzo, A. Expression of cytochrome P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos*, 2006, 34, 75-83.

Audebert, M., Riu, A., Jacques, C., Hillenweck, A., Jamin, E.L., Zalko, D., Cravedi, J.-P., 2010. Use of the γ H2AX assay for assessing the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell lines. *Toxicol. Lett.* 2010, 199, 182-192.

Blagus T., Zager V., Cemazar M., Sersa G., Kamensek U., Zegura B., Nunic J., Filipic M. A cell-based biosensor system HepG2CDKN1A-DsRed for rapid and simple detection of genotoxic agents. *Biosens Bioelectron*, 2014, 64, 102-111.

Casabar R.C., Das P.C., Dekrey G.K., Gardiner C.S., Cao Y, Rose R.L., Wallace A.D. Endosulfan induces CYP2B6 and CYP3A4 by activating the pregnane X receptor. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 245, 335-43.

Cerec, V., Glaise, D., Garnier, D., Morosan, S., Turlin, B., Drenou, B., Gripon, P., Kremsdorf, D., Guguen-Guillouzo, C., Corlu, A. Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology*, 2007, 45, 957-967.

Dubois-Pot-Schneider H, Fekir K, Coulouarn C, Glaise D, Aninat C, Jouarnen K, Le Guével R, Kubo T, Ishida S, Morel F, Corlu A. Inflammatory cytokines promote the retrodifferentiation of tumor-derived hepatocyte-like cells to progenitor cells. *Hepatology*, 2014, 60:2077-90

Dumont, J., Jossé, R., Lambert, C., Anthérieu, S.; Laurent, V., Loyer, P., Robin MA, and Guillouzo A. Preferential induction of the AhR gene battery in HepaRG cells after a single or repeated exposure to heterocyclic aromatic amines. *Tox Appl Pharmacol*, 2010, 249, 91-100.

Glaise D., Ilyin GP., Loyer P., Cariou S., Bilodeau M., Lucas J., Puisieux A., Ozturk M., Guguen-Guillouzo C. Cell cycle gene regulation in reversibly differentiated new human hepatoma cell line. *Cell Growth Diff.*, 1998, 9, 165-176

Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C., and Guguen-Guillouzo, C. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99, 15655-15660.

Guillouzo, A., and Guguen-Guillouzo, C. Evolving concepts in liver tissue modeling and implications for in vitro toxicology. *Expert Opin. Drug. Metab. Toxicol.* 2008, 4, 1279-1294.

Hashizume, T., Yoshitomi, S., Asahi, S., Uematsu, R., Matsumura, S., Chatani, F., Oda, H. Advantages of human hepatocyte-derived transformants expressing a series of human cytochrome P450 isoforms for genotoxicity examination. *Toxicol. Sci.* 2010, 116, 488-497.

Jetten, M.J.A., Kleinjans, J.C.S., Claessen, S.M., Chesné, C., van Delft, J.H.M. Baseline and genotoxic compound induced gene expression profiles in HepG2 and HepaRG compared to primary human hepatocytes. *Toxicol. In Vitro*, 2013, 27, 2031-2040.

Jossé, R., Aninat, C., Glaise, D., Dumont, J., Fessard, V., Morel, F., Poul, JM., Guguen-Guillouzo, C., Guillouzo, A. Long-term functional stability of HepaRG hepatocytes and use for chronic toxicity and genotoxicity studies. *Drug Metab Dispos*, 2008, 36, 1111-1118.

Jover, R., Bort, R., Gomez-Lechon, M.J., and Castell, J.V. (1998) Re-expression of C/EBP alpha induces CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genes in HepG2 cells. *FEBS Lett* 431, 227-230.

Kanebratt, K.P., and Andersson, T.B., Evaluation of HepaRG cells as an in vitro model for human drug metabolism studies. *Drug Metab. Dispos.* 2008, 36, 1444-52.

Kelly, J.H. Permanent human hepatocyte cell line and its use in a liver assist device (LAD). 1994, US patent No. 5,290,684.

Langouet S., Corcos L., Abdel-Razzak Z., Loyer P., Ketterer B., Guillouzo A. Up regulation of glutathione S-transferases alpha by interleukin 4 in human hepatocytes in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1995, 216, 793-800

Lasser, K.E., Allen, P.D., Woolhandler, S.J., Himmelstein, D.U., Wolfe, S.M., Bor, D.H. Timing of new black box warnings and withdrawal for prescription medications. *JAMA*, 2002, 287, 2215-2220.

Laurent, V., Fraix, A., Montier, T., Cammas-Marion, S., Ribault, C., Benvengu, T., Jaffres, P-A., and Loyer, P. Highly efficient gene transfer into hepatocyte-like cells : new means for drug metabolism and toxicity studies. *Biotechnol J*, 2010, 5, 314-320.

Legendre, C., Hori, T., Loyer, P., Aninat, C., Ishida, S., Glaise, D., Lucas-Clerc, C., Boudjema, K., Guguen-Guillouzo, C., Corlu, A., and Morel, F. Drug-metabolising enzymes are down-regulated by hypoxia in differentiated human hepatoma HepaRG cells: HIF1-alpha involvement in CYP3A4 repression. *Eur J Cancer*, 2009, 12, 2882-2892.

Pernelle, K., Le Guevel, R., Glaise, D., Stasio, C.G., Le Charpentier, T., Bouaita, B., Corlu, A., Guguen-Guillouzo, C. Automated detection of hepatotoxic compounds in human hepatocytes using HepaRG cells and image-based analysis of mitochondrial dysfunction using JC-1 dye. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011, 254, 256-266.

Piton A, Rauch C, Langouet S, Guillouzo A, Morel F. Involvement of pregnane X receptor in the regulation of CYP2B6 gene expression by oltipraz in human hepatocytes. *Toxicol In Vitro*, 2010, 24, 452-9.

Quesnot N., Rondel K., Martinais S., Audebert M., Glaise D., Morel F., Loyer P., Robin M-A. Evaluation of genotoxicity using automated detection of gammaH2AX in metabolically competent HepaRG cells. *Mutagenesis*, 2015, in revision.

Suter W., Predictive value of *in vitro* safety studies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2006, 10, 362-366.

Tsuji S., Kawamura F., Hayashi A., Ohbayashi T., Kazuki Y., Chesné C., Oshimura M., Tada M. Dual-color fluorescence imaging to monitor CYP3A4 and CYP3A7 expression in human hepatic carcinoma HepG2 and HepaRG cells. *PLoSOne*, 2014, 9(8):e104123

Wilkening, S., Stahl, F., and Bader A., Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab. Dispos.* 2003, 31, 1035-1042.

Figure legends

Figure 1: A) Procedure routinely used to expand and differentiate HepaRG cells and morphology in phase contrast of HepaRG cells at different stages of differentiation: bipotent progenitors at low density day 1 post trypsination, HepaRG cells at day 7 post trypsination, committed HepaRG hepatocyte-like (H) and biliary (B) cells at day 14 post trypsination and cocultured hepatocyte-like HepaRG and biliary cells at day 30 post trypsination including the last 2 weeks with 2% DMSO treatment (enhancement of liver specific function levels). B) The chart represents the cell count of HepaRG cells in 6 well plates at different times after cell seeding while the histograms show the percentages of cells in G0/G1, S and G2/M phases of the cell cycle measured by the DNA content evaluated by flow cytometry. C) Western blot analysis of the cyclin A, albumin, transferrin, CYP2B6, CYP2E1, CYP3A4, CYP1A1/2, GST Mu and GSTA1 during the proliferation and differentiation of HepaRG cells. HSC70 was used as a loading control.

Figure 2: mRNA expression levels of CYP1A1, CYP2B6, CYP3A4 and GST A1. HepaRG cells were exposed for 24 h to prototypical inducers of DMEs namely Rifampicin (Rif), phenobarbital (PB) and three PAHs (DMBA, Fluo and [B(a)P]. RT-qPCRs were performed to measure expression of the CYP1A1, CYP2B6, CYP3A4 and GST A1. Results are expressed as a fold change compared to untreated control cells and GAPDH was used as a housekeeping gene.

Figure 3: Schematic representations of DME's promoter constructs. CYP1A1 containing distal AHREs, CYP2B6 containing proximal PBREM, GSTA1 proximal promoter, CYP3A4d containing XREM and the XRE construct were used in luciferase and GFP reporter constructs. The CYP3A4p and CYP3A4p+d sequences were exclusively used in luciferase and GFP reporter constructs, respectively.

Figure 4: Activity of luciferase constructs challenged with prototypical drug inducers (μM). HepaRG cells transiently transfected with the DME's promoter driving the luciferase reporter gene were treated for 24h with prototypical inducers for each reporter construct and the transcriptional activities of the plasmids were measured using the luciferase assay.

Figure 5: Activity of luciferase constructs challenged with environmental contaminants. HepaRG cells transiently transfected with the DME's promoter driving the luciferase reporter gene were treated for 24h with ten environmental contaminants (μM) including the mycotoxin aflatoxin B1 (AFB1), the alkylating agent methyl methane sulfonate (MMS), the organochlorine insecticide and acaricide endosulfan (Endo), the phenylpyrazole class insecticide fipronil (Fipro), the brominated flame retardant tetrabromo-bisphenol A (TBBPA), three polycyclic aromatic hydrocarbons (PHAs) [benzo(a)pyrene [B(a)P], dimethylbenzanthracene (DMBA), fluoranthene (Fluo)] and two plasticizers [bisphenol A (BPA) and diethylhexylphthalate (DEHP)]. The transcriptional activities of the plasmids were measured using the luciferase assay.

Figure 6: Visualization of the GFP by fluorescent microscopy in the promCYP1A1-, CYP2B6-, CYP3A4d- and GSTA1-GFP HepaRG biosensor cells. The GFP expressions

correlating with the transcriptional activities of the CYP1A1, CYP2B6, CYP3A4d, were observed at days 1, 14 and 31 (in presence or absence of DMSO) after HepaRG cell seeding.

Figure 7: GFP protein detection by western blot in the promCYP1A1-, CYP2B6-, CYP3A4d- and GSTA1-GFP HepaRG biosensor cells. A time-course analysis of the GFP expression in the promCYP1A1-, CYP2B6-, CYP3A4d- and GSTA1-GFP HepaRG biosensor cells was performed by western blot and compared to the expression of the corresponding endogenous DME proteins, the CYP1A1, CYP2B6, CYP3A4 and GSTA1 in each cell line. HSC70 was used as a loading control.

Figure 8: Evaluation of the GFP expression by flow cytometry in stable recombinant biosensor HepaRG cells. The induction of the stable recombinant biosensor HepaRG cells was evaluated by measuring the fluorescence emitted by the GFP in biosensor HepaRG cells following treatments with xenobiotics including DMBA, [B(a)P], Fluo, Endo, DEHP Rif, PB and Fipro. Flow cytometry was performed using a FACSCalibur (Becton Dickinson) and the fluorescence was measured on the FL1H channel using CellQuest software (Becton Dickinson).

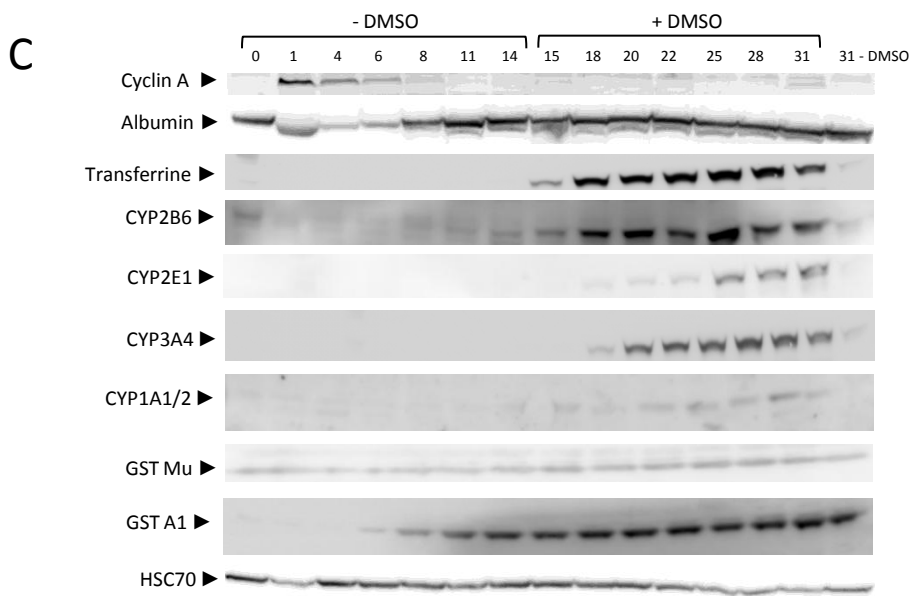
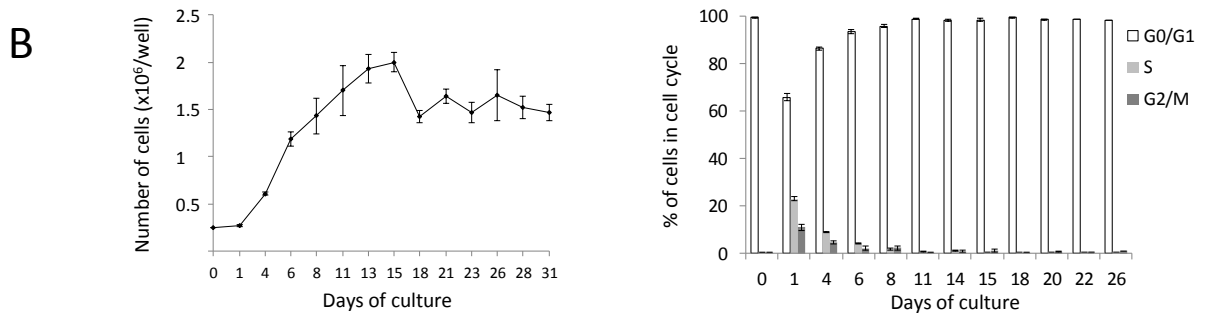
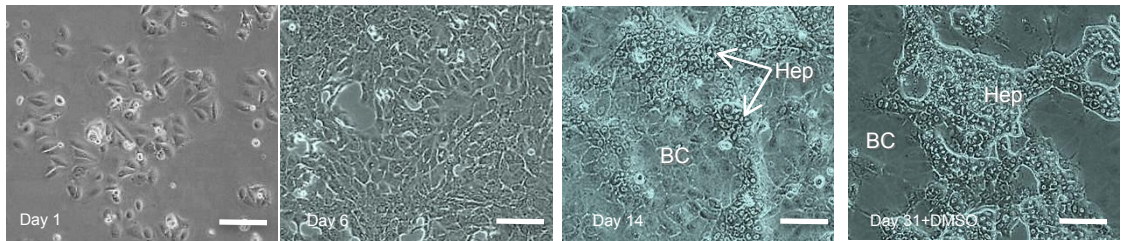
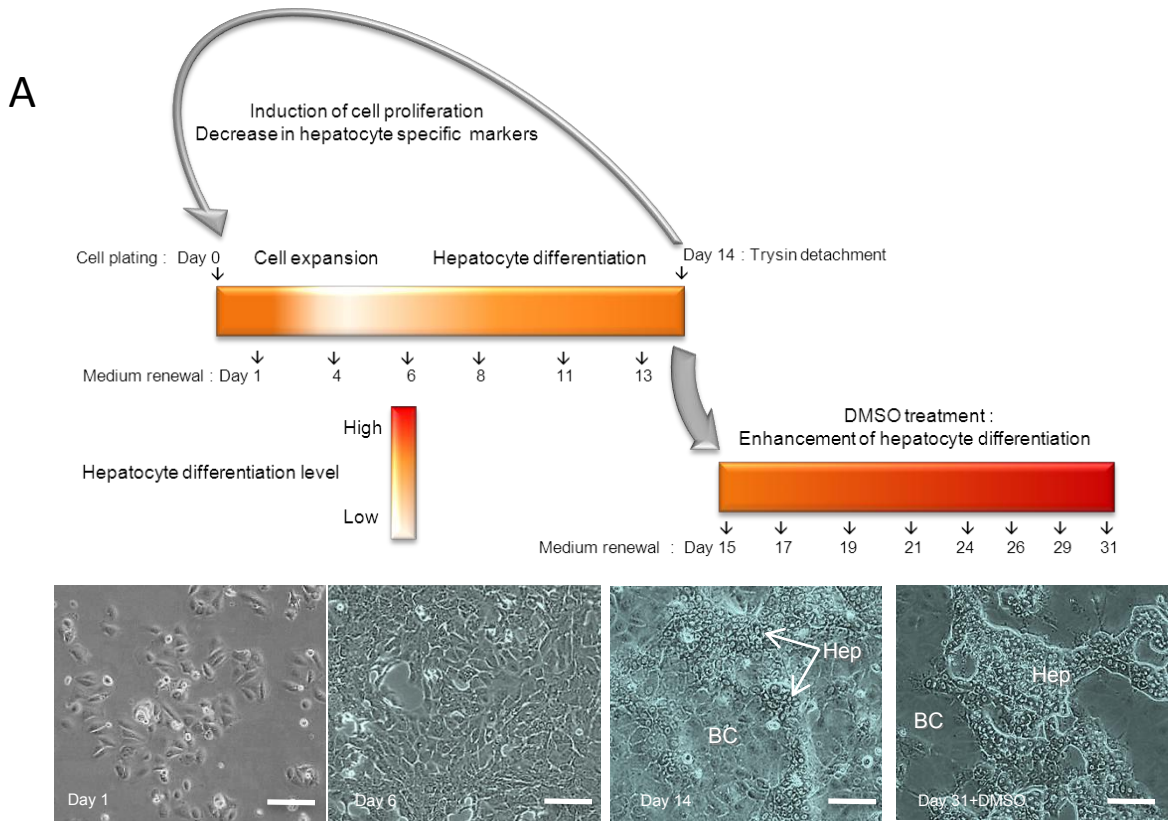


Figure 1

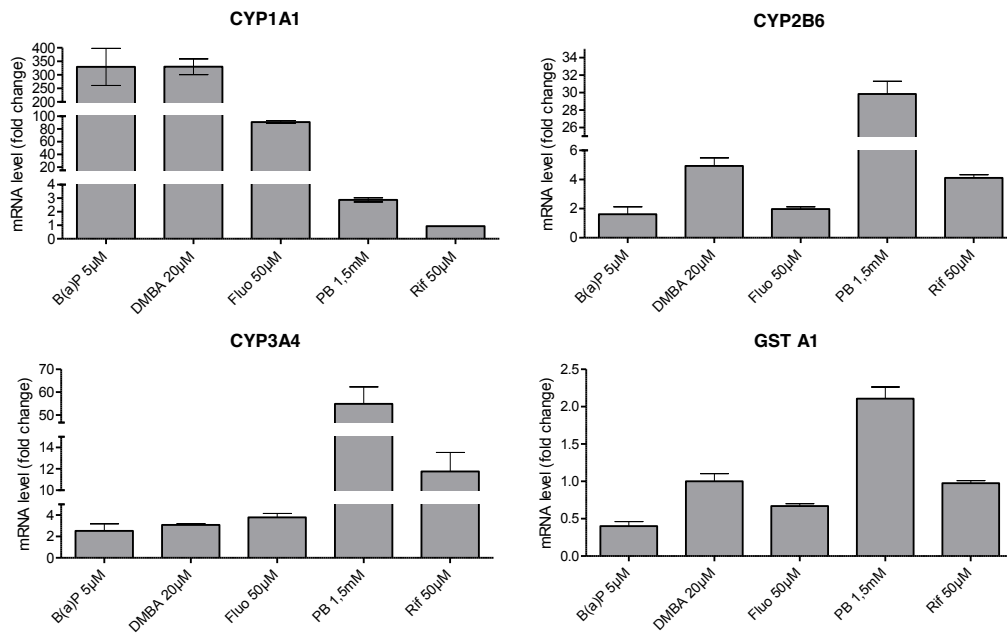


Figure 2

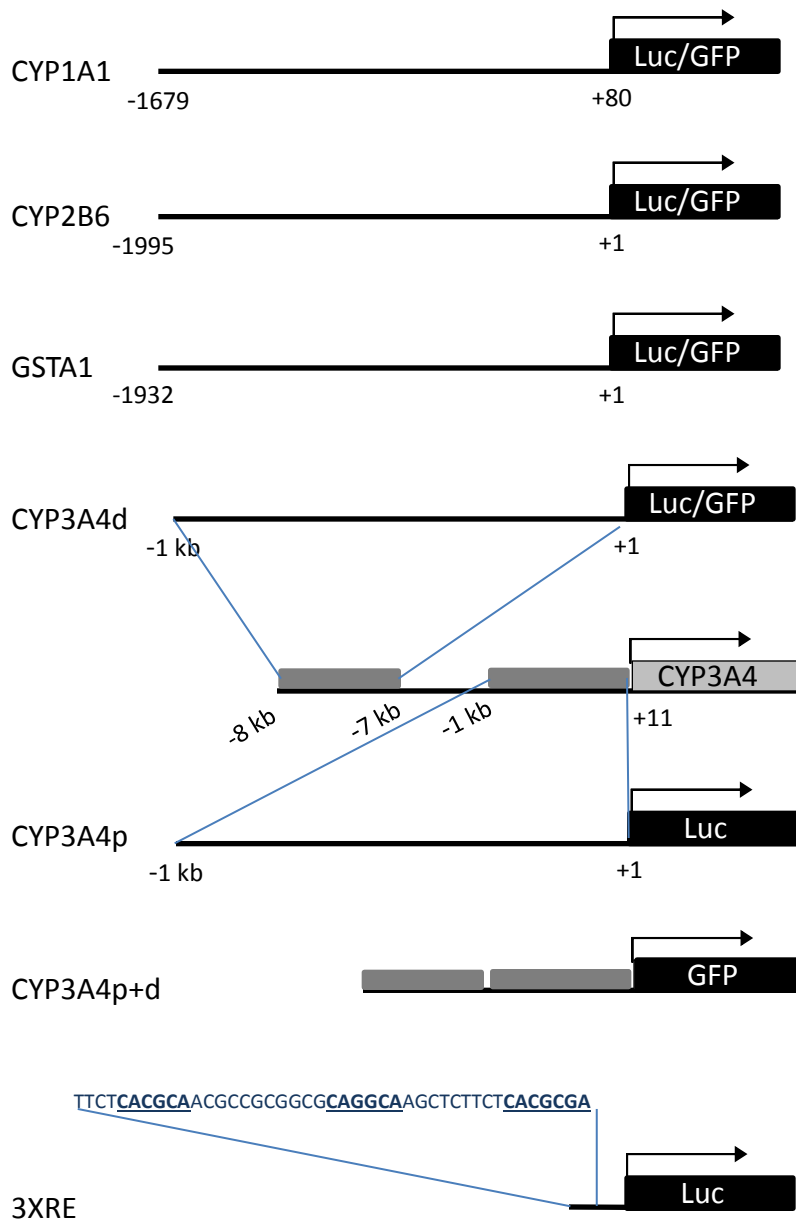


Figure 3

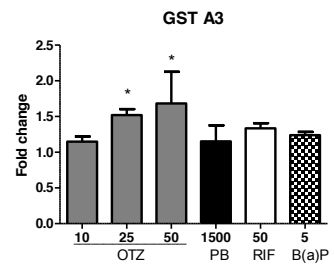
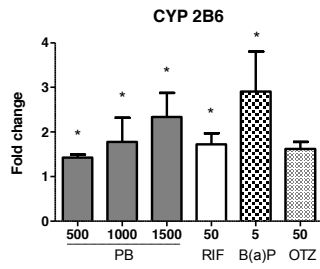
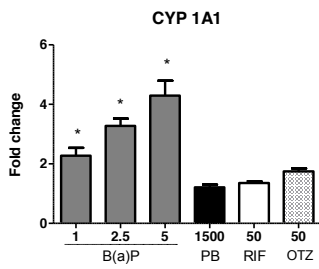
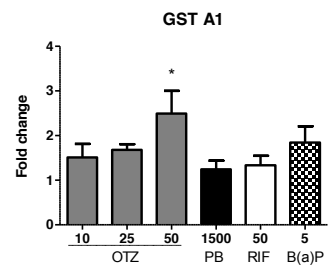
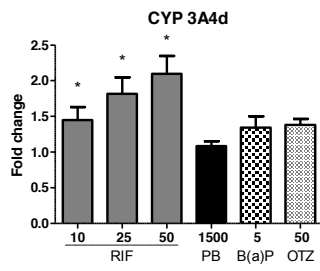
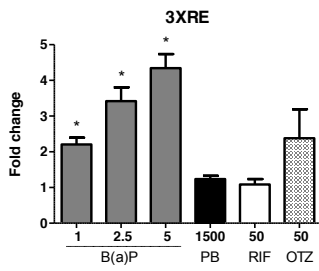


Figure 4

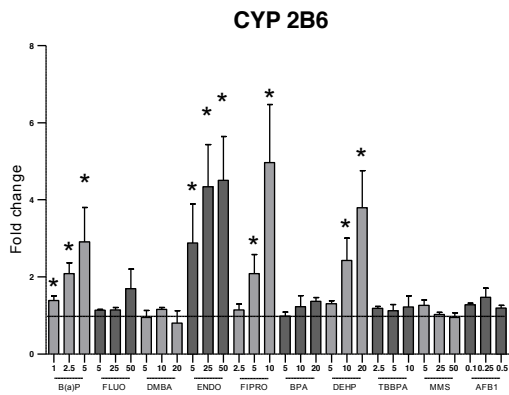
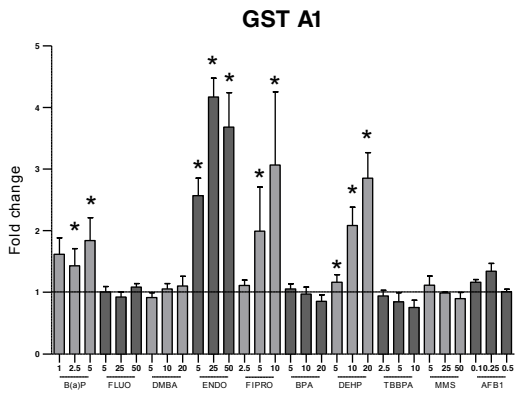
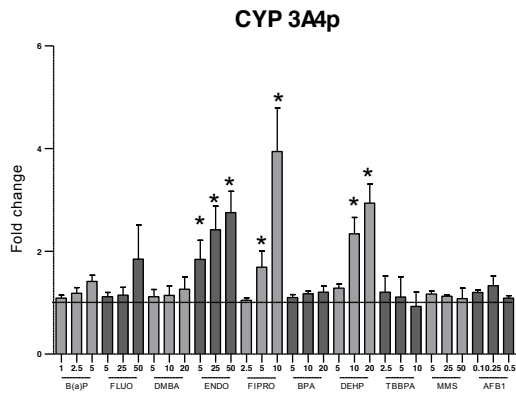
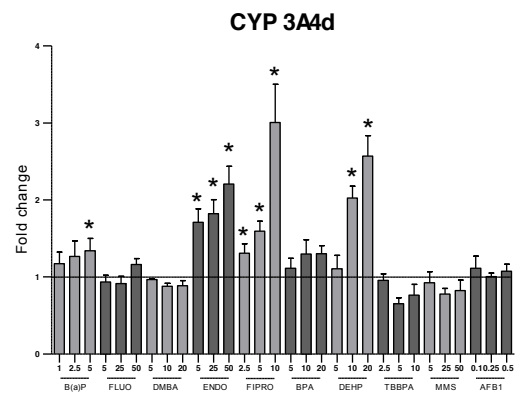
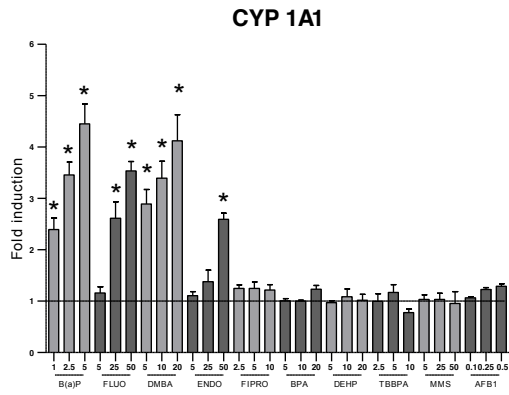
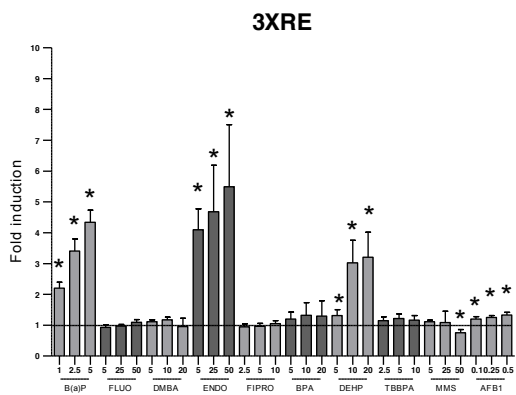


Figure 5

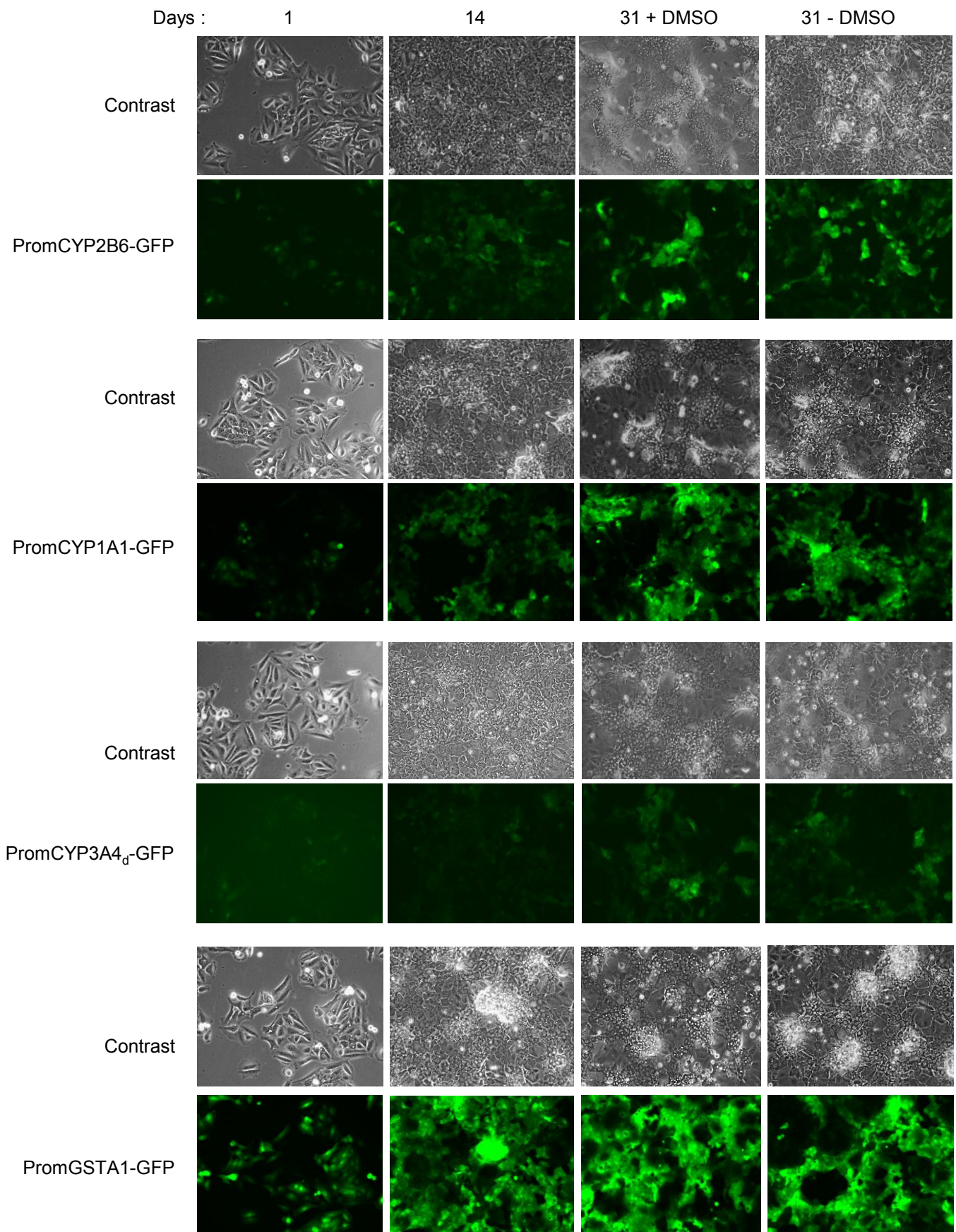


Figure 6

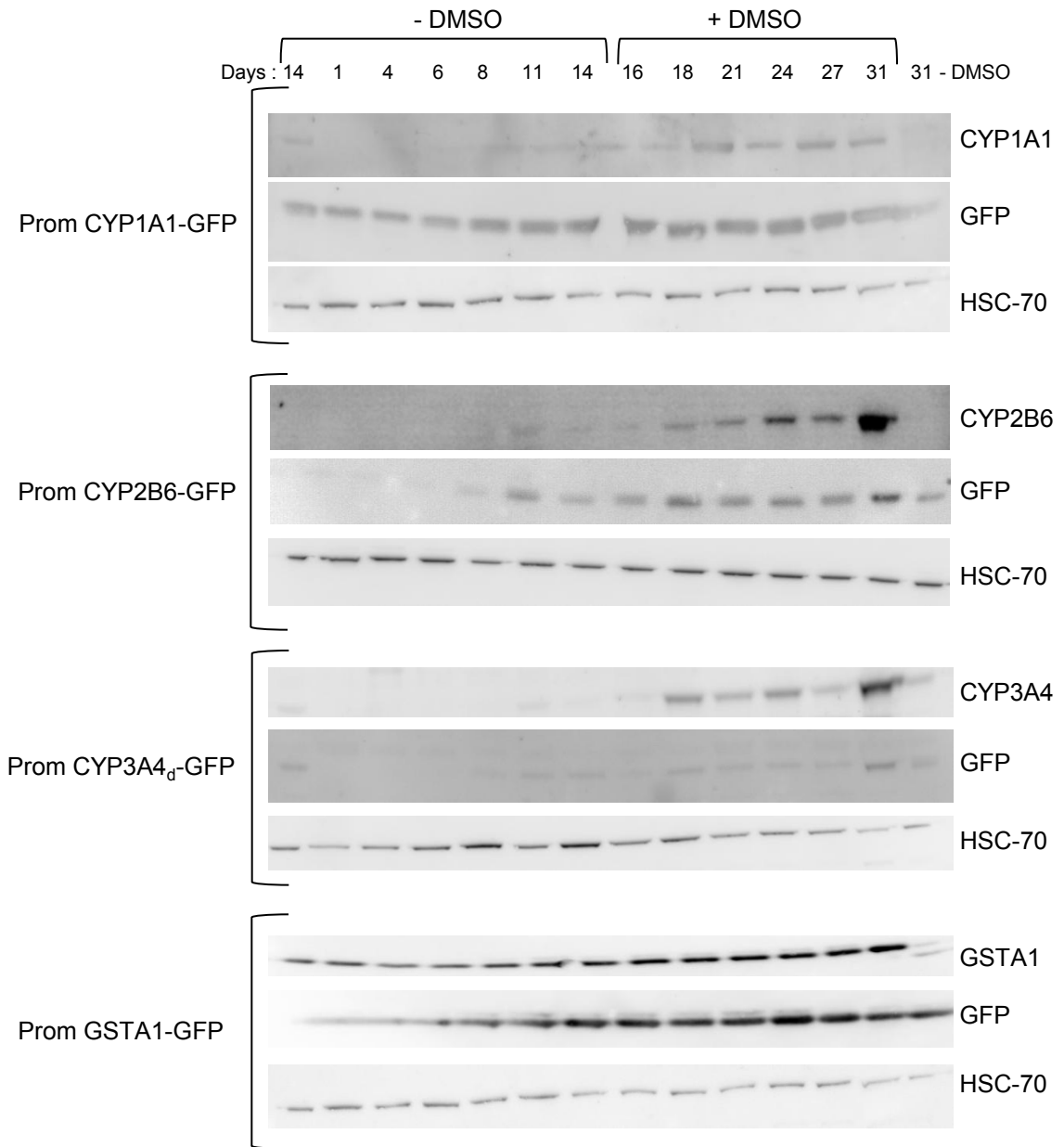


Figure 7

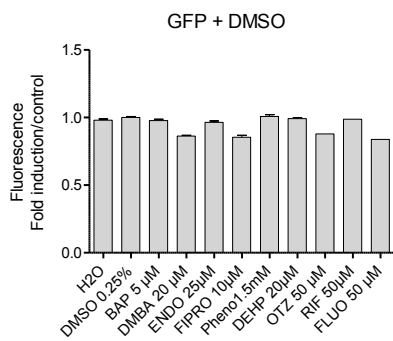
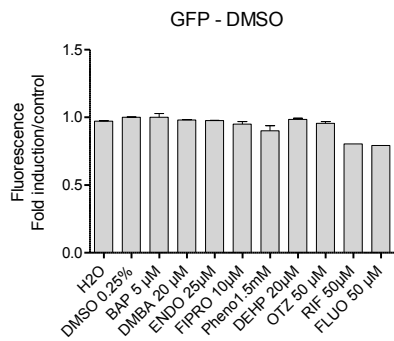
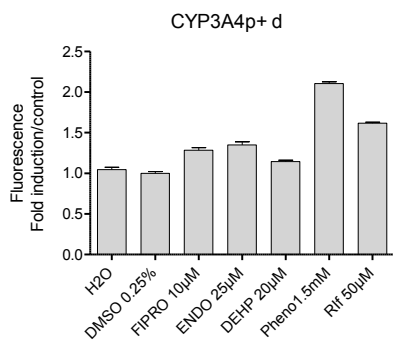
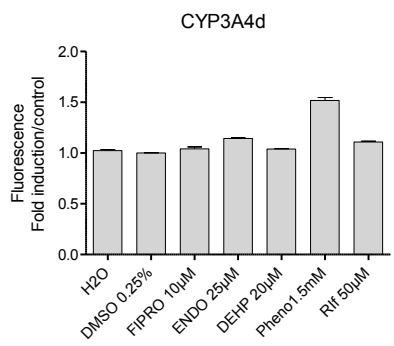
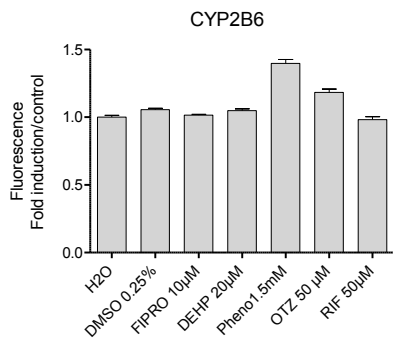
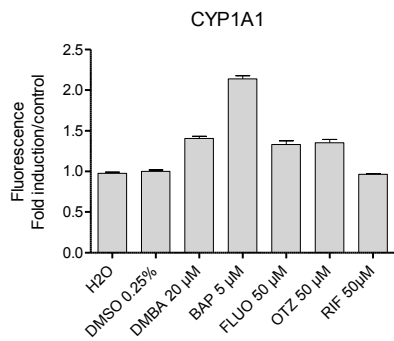


Figure 8

4. Article 3

Expression et activité du cytochrome P450 2E1 dans les modèles de culture d'hépatocytes

Cet article est actuellement en préparation

1. Mesure de l'activité du CYP2E1 au sein du modèle HepaRG

1.1. Introduction

Le CYP2E1 est impliqué dans le métabolisme de nombreuses molécules exogènes d'intérêt toxicologique telles que l'éthanol, le paracétamol et l'acrylamide, ainsi que dans l'activation de nombreux procarcinogènes tels que les nitrosamines. Ce CYP possède plusieurs particularités : d'une part, il est responsable de la formation de métabolites réactifs comme par exemple le NAPQI produit lors du métabolisme du paracétamol, mais il est également impliqué dans la formation d'EROs par l'intermédiaire de son cycle catalytique. Les effets délétères de ce stress sont potentialisés par la présence de CYP2E1 au sein d'organites particulièrement sensibles aux EROs comme la mitochondrie. L'importance de ce CYP en toxicologie est renforcée du fait de son induction dans certaines physiopathologies telles que l'obésité et le diabète de type 2 où il constitue, à lui seul, un facteur de risque dans le développement de stéatohépatites et d'hépatites médicamenteuses (Fromenty, 2013; Knockaert et al., 2011).

De par l'importance clinique que revêt l'étude du CYP2E1, il est nécessaire d'avoir à disposition des substrats spécifiques de cette enzyme qui soient utilisables *in vitro* et *in vivo* afin d'en mesurer l'activité. Plusieurs substances sont disponibles telles que l'aniline, le *p*-nitrophénol ou encore la N-diméthylnitrosamine. Cependant, ces molécules sont des toxiques qui ne peuvent être utilisés chez l'Homme. A l'heure actuelle, seule la chlorzoxazone répond à cette prérogative. Cette molécule est largement utilisée comme marqueur de l'activité du CYP2E1 *in vitro* et *in vivo* chez l'Homme et l'animal (Leclercq et al., 1998; Mehvar et al., 2006; O'Shea et al., 1994). Le CYP2E1 est majoritairement responsable de la formation du seul métabolite primaire identifié, la 6-hydroxychlorzoxazone (HCZX), même si certaines études rapportent une participation mineure des CYP3A et 1A dans cette réaction (Court et al., 1997; Gorski et al., 1997; Ono et al., 1995). *In vivo*, chez l'Homme il est établi que ce métabolite est ensuite rapidement conjugué avant d'être excrété par voie urinaire où la forme glucuronidée représente entre 50 et 80% de la dose administrée contre seulement 40 à 50% chez l'animal (Ahn et al., 2003; Kim et al., 2003; O'Shea et al., 1994). Si chez le rat, l'excrétion biliaire semble expliquer partiellement la fraction de chlorzoxazone

qui n'est pas retrouvée dans les urines, l'hypothèse d'un métabolisme alternatif de la chlorzoxazone reste possible (Mehvar et al., 2006).

Le dosage de la 6-hydroxychlorzoxazone au sein de matrice biologique nécessite l'utilisation d'une β -glucuronidase afin de pouvoir doser la fraction d'HCZX glucuronidée. Cependant, l'efficacité de l'hydrolyse peut varier en fonction de la matrice et de la nature du glucuronide concerné (Elsohly et al., 2005; Taylor et al., 2005). *In vitro* sur cellules, aucune étude ne rapporte la présence de métabolite autre que l'HCZX, ni la nécessité de réaliser cette hydrolyse.

Il existe plusieurs modèles cellulaires permettant d'étudier le CYP2E1 *in vitro*. Si les hépatocytes humains en culture primaire malgré leurs limites (variabilité interindividuelle, qualité et disponibilité aléatoires), restent le standard idéal, les lignées recombinantes telles que le modèle HepG2 (E47) exprimant le CYP2E1 peuvent constituer une première alternative (Cederbaum, 2006; Chen et al., 1998). Elles permettent l'étude du stress oxydatif et de l'activation métabolique due au CYP2E1, mais ne prennent pas en compte l'influence du métabolisme de phase II et III. De plus, leur pertinence est limitée en ce qui concerne les études de régulation transcriptionnelle et traductionnelle. Le modèle HepaRG, dérivé d'un hépatocarcinome humain, exprime de nombreuses fonctions hépatiques telles que l'expression des enzymes de phase I, de phase II, des transporteurs membranaires et des récepteurs nucléaires. En toxicologie, ces cellules constituent une alternative de choix aux hépatocytes humains. Cependant, si dans ce modèle le niveau d'expression des ARNm du CYP2E1 représente moins de 5% du niveau retrouvé dans les hépatocytes humains fraîchement isolés (FIH), il est néanmoins très similaire au niveau d'expression retrouvé dans les cultures primaire d'hépatocytes humains (Aninat et al., 2006; Guillouzo et al., 2007). En termes d'activité, par quantification de l'HCZX en méthode cocktail, Anthérieu et al. (2010) retrouvent des valeurs d'environ 15 ; 5 et inférieure à 0,5 pmoles.min.mg de protéines respectivement dans les FIH, les cultures d'hépatocytes humains et de cellules HepaRG différenciées. Ces résultats semblent soutenus par les travaux de Gerbal-chaloin et al., (2014) et Turpeinen et al., (2009), rapportant respectivement une activité faible et nulle dans le modèle HepaRG. Par opposition, Aninat et al., (2006) rapportent une activité de 483 pmoles.min.mg de protéines pour des HepaRG différenciées.

La lignée HepaRG présente donc bien une activité mesurable du CYP2E1. Cependant, en raison de la divergence des résultats obtenus, nous avons dans un premier temps considéré qu'il était nécessaire d'accroître l'activité enzymatique du CYP2E1. Nous avons pour cela créé un modèle HepaRG recombinant surexprimant le CYP2E1 afin de se rapprocher du niveau d'expression retrouvé dans les hépatocytes humains.

Nous avons conduit ces travaux avec plusieurs objectifs :

- i. comparer l'activité du CYP2E1 au sein de différents modèles hépatocytaires sauvages et recombinants (HepaRG, HepG2) par mesure de l'HCZX formée.

Cette étape, utilisant le dosage de l'HCZX afin de quantifier l'activité du CYP2E1, a été nécessaire pour caractériser nos lignées recombinantes et pour pouvoir se situer vis-à-vis des études antérieures.

- ii. déterminer les profils d'expression transcriptionnelle des principales UGTs au sein de ces différents modèles.

La littérature rapporte l'existence d'un glucuronide de l'HCZX *in vivo*. Cependant, aucune étude n'a réellement comparé l'expression de ces enzymes au sein des modèles hépatocytaires utilisés dans notre étude, ni caractérisé la pharmacocinétique de ce glucuronide.

- iii. mettre au point une méthode de dosage HPLC-UV sur milieu de culture, permettant de prendre en compte les métabolites de phase II de la CZX et déterminer le profil métabolique de la CZX au sein de nos différents modèles.

S'il est vrai que le CYP2E1 est principalement responsable de la formation de l'HCZX, cela fait-il pour autant de l'HCZX un bon marqueur de l'activité du CYP2E1 ?

1.2. Matériels et méthodes

✓ Culture cellulaire

La lignée HepG2 (European Collection of Cell Cultures ; Salisbury, UK), les cellules HepaRG et les hépatocytes humains (BIOPREDIC, Saint Grégoire, France) sont cultivés dans leur milieu respectif à 37°C et avec 5% de CO₂. Les HepG2 sontensemencés à $2,6 \times 10^4$ cellules.cm² dans du milieu MEM α (Gibco) supplémenté d'acides aminés non essentiels et repiquées chaque semaine. Les HepaRG sontensemencées à $2,6 \times 10^4$ cellules.cm² dans du milieu Williams'E supplémenté par 5 μ g.ml d'insuline et 50 μ M d'hydrocortisone. Après 15 jours de prolifération, le milieu est supplémenté par 2% de DMSO et les cellules sont laissées en

différenciation 15 jours supplémentaires avant d'être trypsinées et réensemencées. En culture primaire, les hépatocytes humains sont ensemencés à $1,5 \times 10^5$ cellules.cm² dans le même milieu que les cellules HepaRG mais sans hydrocortisone pendant les 12 premières heures.

Tous les milieux sont par ailleurs supplémentés avec 100 unités.µl de pénicilline et 100 µg.ml de streptomycine, 2 mM de glutamine et 10% de sérum de veau foetal.

✓ Infection lentivirale

L'ADNc du *hCYP2E1wt* fourni par le docteur De Waziers a été sous-cloné dans le plasmide pHAGE-PGK-MCS-IZsGreen-W fourni par la société Vectalys (Toulouse, France), chargée par la suite de la production lentivirale. Les cellules HepaRG non différenciées et les cellules HepG2 ont été infectées à raison de 20 particules virales par cellule (MOI) et laissées en prolifération pendant une semaine avant d'être triées par cytométrie en flux grâce au gène rapporteur de la GFP (Green Fluorescent Protein) présent dans le plasmide. Seules les cellules positives pour la GFP ont été sélectionnées puis ensemencées pour obtenir la lignée stable.

✓ Western blot

Les cellules préalablement ensemencées en plaque 12 puits ont été lysées à l'aide de tampon RIPA (Tris-HCl 50mM ; NaCl 150mM ; azide de sodium 0,02% ; sodium dodecyl sulfate 0,1% ; Nonidet P-40 1% ; sodium désoxycholate 0,5%). La concentration protéique a été déterminée par dosage colorimétrique basé sur l'acide bicinchoninique (Pierce™ BCA Protein Assay Kit) et 15 µg de protéines totales ont été déposés sur gel de polyacrylamide (NuPAGE®Novex® 4-12% Bis Tris gels, Invitrogen). Après transfert sur membrane de nitrocellulose (Trans-blot® Turbo™ Transfert System, Bio-Rad) et saturation (PBS 1X-BSA 3%-Tween 20 0,2%), l'incubation avec l'anticorps primaire (CYP2E1, Oxford Biomedical Research ; HSC70 Santa Cruz) est réalisée sur la nuit à 4°C. Les anticorps secondaires polyclonaux correspondant couplés à la peroxydase (Dako) ont été utilisés afin de permettre une révélation par chimiluminescence (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate).

✓ PCR quantitative

Le kit (SV total RNA isolation System, Promega, Madison,WI) a permis l'extraction des ARNs totaux. La retro-transcription en ADNc a été réalisée à l'aide du kit High capacity cDNA reverse transcription (Applied Biosystems, foster city) et la PCR quantitative grâce au Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) dans un thermocycleur 7900 HT (Applied Biosystems). L'expression relative de l'ARNm d'intérêt a été calculée après normalisation sur le gène de ménage *GAPDH*.

✓ Mesure d'activité et inhibition

La mesure de l'activité a été réalisée sur des cellules cultivées en plaque 24 puits. Les cellules sont incubées pendant 4 heures dans 150 µl de milieu william's supplémenté avec 300 µM de chlorzoxazone ou 100 µM de 6-hydroxychlorzoxazone sans rouge de phénol ni sérum. En fin d'incubation, le milieu et les cellules sont conservés à -20°C. Lors des tests d'inhibition, les cellules sont pré-incubées pendant 2 heures avec l'inhibiteur en milieu william's, avant la co-incubation avec la chlorzoxazone et l'inhibiteur pendant 4 heures.

Le dosage a été réalisé à température ambiante sur une chaîne HPLC AGILENT 1100. La séparation avec une colonne ACE Excel 2 Super C18 (75 × 3 mm) grâce l'utilisation d'un gradient d'élution (0,7 ml.min) allant de 2 à 60 % d'acétonitrile sur 10 minutes. Le solvant aqueux utilisé dans le mélange binaire est constitué d'acide acétique 0,1% additionné d'hydrochlorure de triéthylamine 0,25% (m/v). La détection est réalisée dans l'UV à 284nm. A l'exception de la chlorzoxazone dissoute directement dans le milieu, toutes les molécules sont reprises et aliquotées dans du méthanol. Le dosage des échantillons inconnus a été réalisé sans traitement préalable et grâce à une gamme d'étalonnage externe. Chlorzoxazone et 6-hydroxychlorzoxazone (Sigma); 6-hydroxychlorzoxazone β-D glucuronide (Toronto Research chemical, Canada); chlorzoxazone N-glucuronide (Bertinpharma, France).

1.3. Résultats

1.3.1. Expression du CYP2E1 et mesure de l'HCZX formée

Nous avons de prime abord vérifié l'expression du CYP2E1 tout au long du cycle de différenciation dans les cellules HepaRG issues de la lignée mère et de la lignée

recombinante surexprimant le CYP2E1 en présence ou non de DMSO. Pour rappel, le modèle estensemencé à faible densité ; après 15 jours de prolifération, le milieu est supplémenté par 2% de DMSO et les cellules sont laissées en différenciation pendant 15 jours supplémentaires.

Dans la lignée sauvage, l'expression du CYP2E1 est visible à partir de 16 jours et seulement en présence de DMSO. En revanche dans la lignée recombinante, l'expression protéique du CYP2E1 est visible dès 7 jours et en absence de DMSO. Par la suite, l'expression augmente successivement jusqu'à 30 jours et celle-ci est également potentialisée par le DMSO. Le CYP2E1 recombinant est exprimé dans les cellules progénitrices et son expression augmente lors de la différenciation des cellules en absence de DMSO. En présence de ce dernier, l'expression est encore renforcée par l'expression du CYP2E1 endogène.

Grâce au modèle HepG2, nous disposons d'un modèle contrôle dépourvu de CYP2E1 à l'état sauvage. L'expression du CYP2E1 recombinant au sein des cellules HepG2 semble comparable au niveau d'expression au sein du modèle HepaRG 2E1.

Ensuite, nous avons souhaité corrélérer l'expression de la protéine avec l'activité du CYP2E1 mesurée par la quantification de l'HCZX. Pour les modèles HepG2 et HepG2 recombinant, les résultats sont cohérents avec le western blot : les cellules HepG2 sauvages sont caractérisées par une absence totale d'activité alors que le modèle recombinant présente une activité proche de 100 pmoles.min.mg de protéines.

En revanche, dans les cellules HepaRG, si comme attendu l'activité du modèle recombinant est plus élevée que celle du modèle sauvage, l'ordre de grandeur est 50 fois plus faible, passant de 100 pour les cellules HepG2 CYP2E1 à 2 pmoles.min.mg pour les cellules HepaRG CYP2E1 malgré une expression protéique comparable. De plus, les valeurs obtenues dans les modèles HepaRG sont à relativiser puisqu'elles sont proches (HepaRG 2E1) ou inférieures (HepaRG wt) à la limite de quantification.

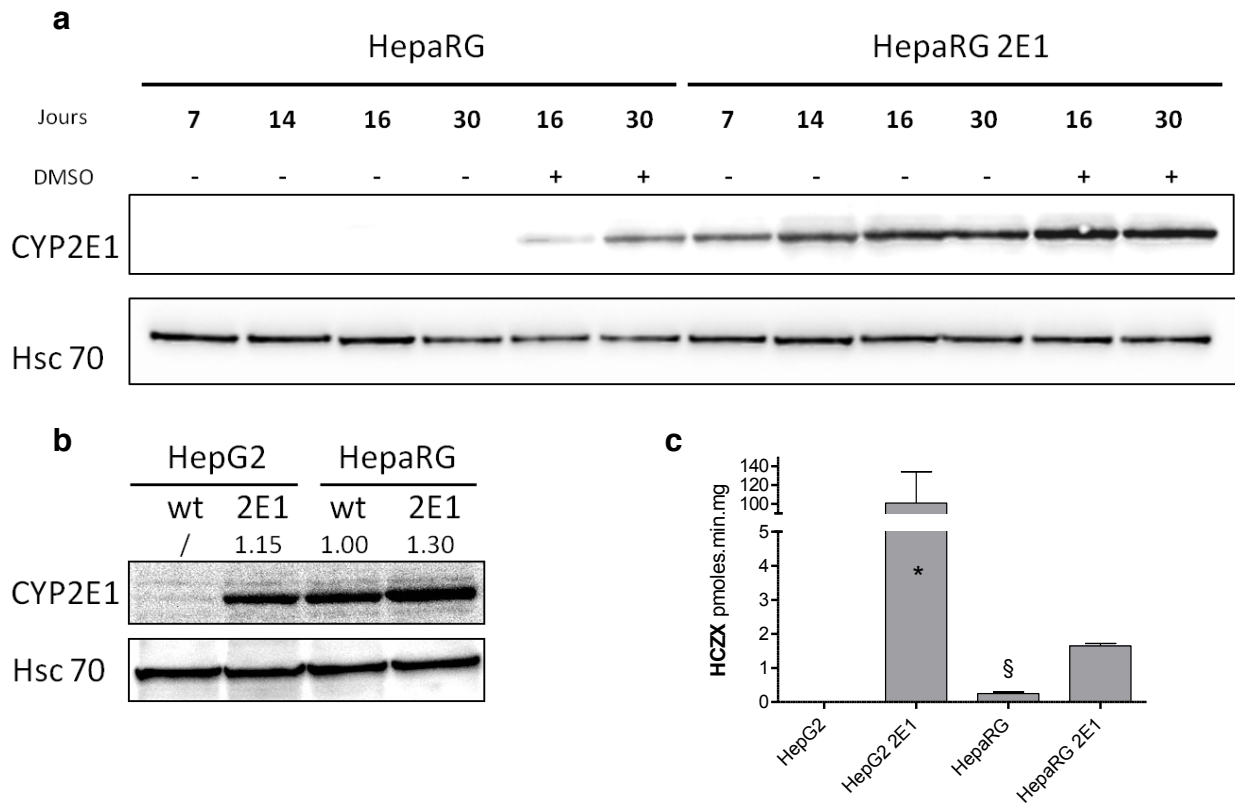


Figure 1 : Profils d'expression protéique du CYP2E1 et dosage de l'HCZX dans les lignées HepG2 et HepaRG. (a) Expression protéique du CYP2E1 dans les cellules HepaRG au cours de leur différenciation en présence ou non de DMSO et (b) à 30 jours comparé au modèle HepG2, les valeurs numériques représentent les résultats de densitométrie. (c) Dosage de l'HCZX formée. (test de student *.p < 0,05 comparé à HepaRG 2E1 ; [§] Valeur inférieure à la limite de quantification HPLC-UV)

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette différence d'activité entre nos lignées recombinantes malgré les conditions similaires utilisées lors des infections lentivirales.

Dans les hépatocytes de rat et cellules V79 recombinantes, Oesch-Bartlomowicz et al. (1998) ont démontré que la phosphorylation de la sérine 129 était responsable d'une diminution d'environ 30% de l'activité du CYP2E1 mesurée par l'hydroxylation du *p*-nitrophénol et par la déméthylation de la NDMA, sans altération de l'expression protéique. De même, lors de la traduction, cette phosphorylation diminue l'affinité de la SRP avec le peptide naissant et favorise l'adressage à la mitochondrie. Dans cette configuration, le CYP2E1 est fixé sur la membrane mitochondriale interne. Dès lors, il est possible que l'accessibilité au substrat soit moindre en comparaison d'un CYP microsomal.

Il se peut que le statut en AMPc intracellulaire et/ou l'activité basale de la protéine kinase A impliquée dans ce processus, différent entre nos modèles cellulaires et puissent expliquer

une variabilité d'activité catalytique. Cependant, la différence particulièrement contrastée observée entre nos deux modèles nous a conduits à explorer une seconde hypothèse.

1.3.2. Profil d'expression transcriptionnelle des différentes UGTs

Si généralement les cellules HepG2 sont caractérisées comme un modèle exprimant peu de XMEs, certains travaux montrent une expression substantielle de certaines enzymes (Hewitt et al., 2004) notamment des enzymes de phase II comme les UGTs. En revanche, l'expression des XMEs à des niveaux similaires aux hépatocytes humains est établi pour le modèle HepaRG (Guillouzo et al., 2007).

Puisque l'existence d'un glucuronide de l'HCZX est rapportée *in vivo*, il était vraisemblable qu'une différence d'expression des UGTs entre ces deux lignées puisse être à l'origine d'un métabolisme alternatif de l'HCZX. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons déterminé le profil d'expression des ARNm des principales UGTs hépatiques pour nos modèles hépatocytaires (Bock, 2010; Mackenzie et al., 2008).

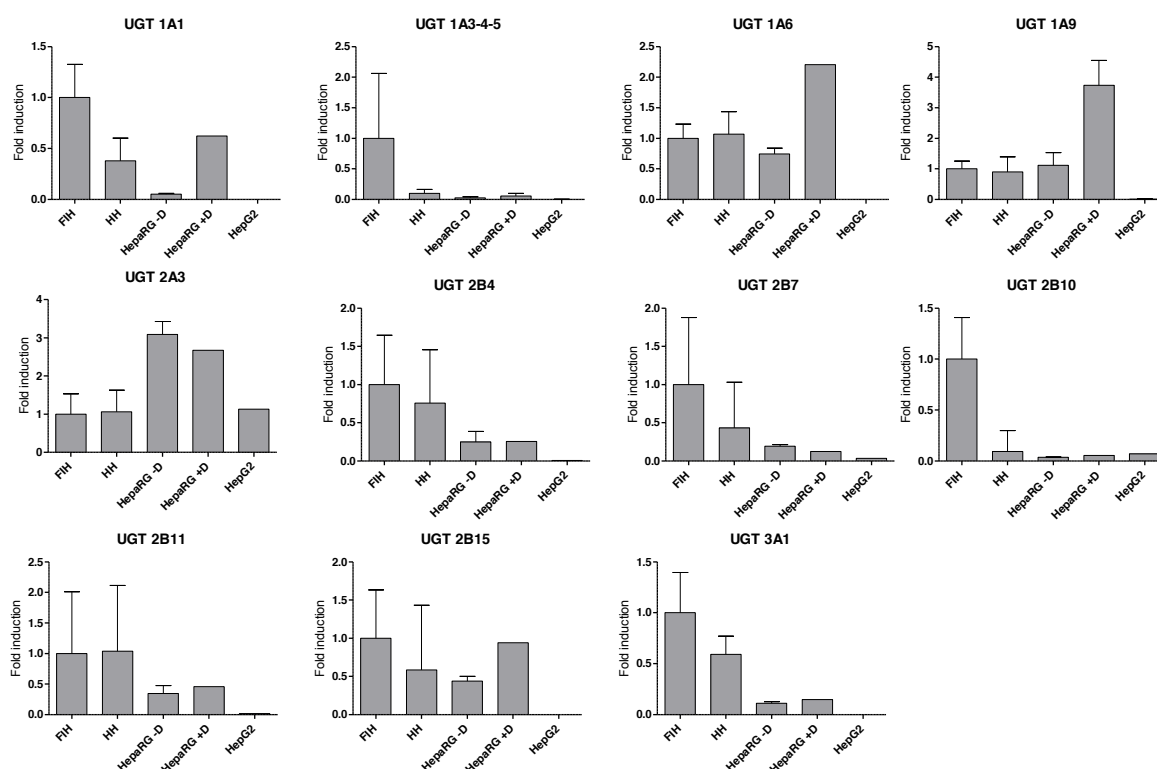


Figure 2 : Expression des ARNm des principales UGTs hépatiques dans nos modèles hépatocytaires. hépatocytes humains fraîchement isolées (FIH) et en culture primaire (HH) ; HepaRG différencié avec (+D) et sans (-D) DMSO et HepG2.

A l'exception des UGTs 1A9, 1A6, 2A3 et 2B11, l'expression des UGTs est généralement plus faible dans les hépatocytes humains en culture primaire comparé aux FIH. Ce phénomène, déjà décrit pour de nombreuses XMEs, reflète l'instabilité phénotypique en culture des hépatocytes humains.

L'utilisation du DMSO dans le processus de différenciation du modèle HepaRG permet d'augmenter l'expression des XMEs. Cela s'est confirmé dans nos résultats seulement pour les UGT1A et l'UGT2B15. En effet, les UGT2A, les autres UGT2B et l'UGT3A1 ne semblent pas différenciellement exprimées en présence de DMSO.

Enfin, excepté les UGT2A3, 2B7 et 2B10 exprimées à des niveaux similaires au sein de nos lignées, les résultats confirment l'absence d'expression de la plupart des UGTs dans le modèle HepG2 et renforcent notre hypothèse concernant l'implication des UGTs dans le métabolisme de la CZX *in vitro*.

1.3.3. Validation de la méthode de dosage

Confortés par les résultats précédents, nous avons poursuivi nos travaux en développant un dosage HPLC-UV permettant de détecter les glucuronides de la CZX. Au début de ma thèse, excepté la 6-hydroxychlorzoxazone, aucun autre standard n'était disponible sur le marché. C'est seulement depuis 2014, que deux glucuronides dérivés de la CZX sont proposés à la vente (chlorzoxazone-N-glucuronide, chlorzoxazone-6-O-glucuronide) sans être pour autant décrit dans la littérature.

En tenant compte des données disponibles et de la structure des différents composés, nous proposons dans le schéma présenté en figure 3, le métabolisme de la CZX le plus probable (Mehvar et al., 2006; Peter et al., 1990). Celui-ci a servi de fil conducteur pour notre étude. Pour faciliter la compréhension des données, le code couleur sera conservé par la suite.

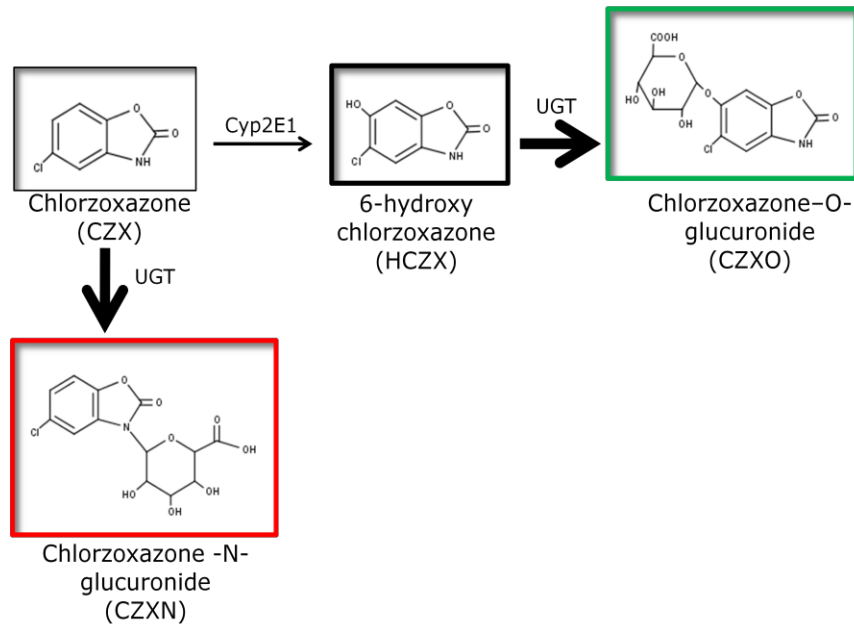


Figure 3 : Métabolisme hypothétique de la chlorzoxazone. (Mehvar et al., 2006; Peter et al., 1990)

La méthode de dosage développée a fait l'objet d'une validation rigoureuse suivant les recommandations de l'ICH Q2 (International Conférence on Harmonisation, Q2 : Validation of analytical procedures). L'évaluation a été réalisée de manière intra-jour et inter-jours pour chaque métabolite et selon plusieurs critères : spécificité, linéarité, justesse, précision et les limites de quantification ont été calculées. (Tableau 1).

✓ Sélectivité :

Les chromatogrammes sont caractérisés par un bruit fond particulièrement faible. Seuls deux pics résiduels issus du milieu de culture sont présents dans l'intervalle d'intérêt de l'élution mais n'interfèrent pas avec les autres pics (figure 4a). Les temps de rétention sensiblement différents entre les composés d'intérêt ainsi que la finesse et la symétrie des pics permettent d'obtenir des facteurs de résolution supérieurs à 1,5.

✓ Linéarité

La linéarité évaluée par la méthode des moindres carrés a été réalisée à partir de gammes pour chaque métabolite allant de 3,12 à 100 μM . Les coefficients de régression obtenus sont supérieurs à 0,999.

✓ Justesse et précision

La justesse et la précision (RSD%) déterminées de manière intra et inter-jours pour chaque composé n'excèdent pas 10% et 5% respectivement.

✓ Limite de quantification (LQ)

Ces valeurs ont été calculées sur la base de la pente (p) et de la déviation standard résiduelle (σ) de la courbe de calibration propre à chaque métabolite ($LQ = 10 \sigma / p$) (tableau 1)

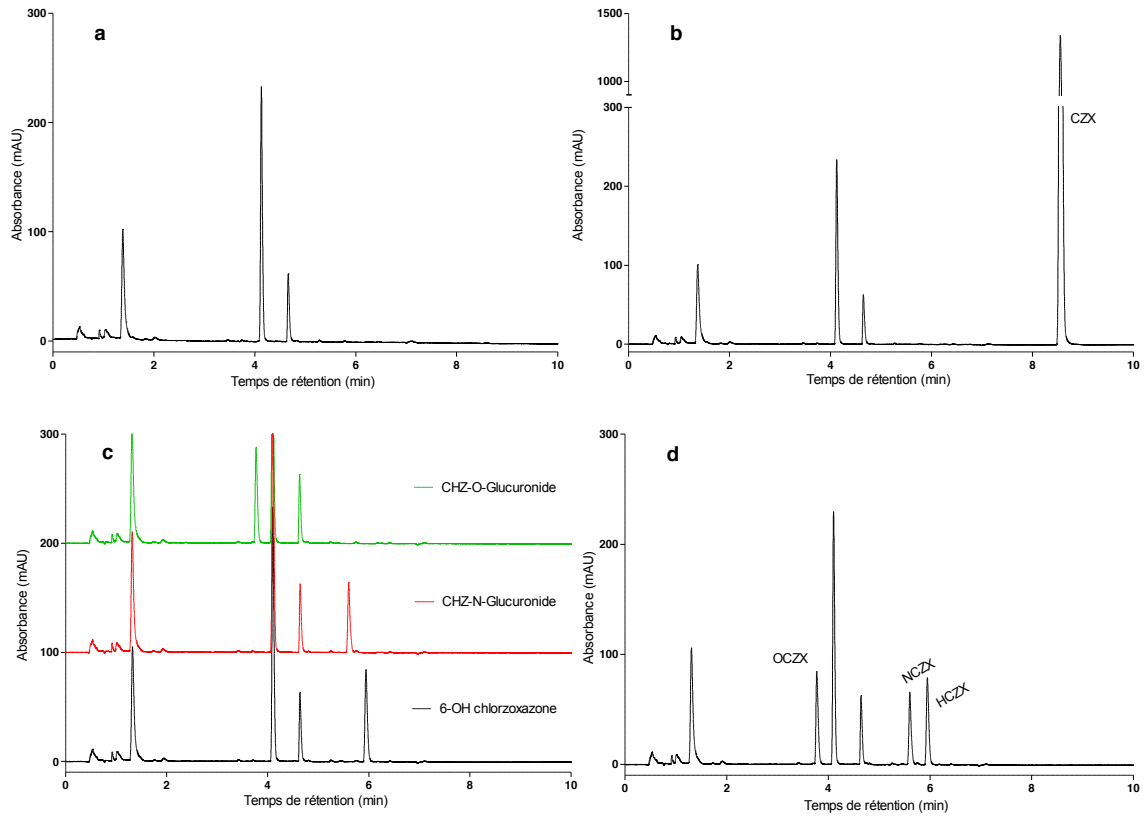


Figure 4 : Chromatogramme des différentes molécules dans du milieu William's E. (a) milieu seul ; (b) milieu + CZX (chlorzoxazone) ; (c) milieu + métabolites séparés ; (d) milieu + métabolites en mélange (HCZX, 6-hydroxychlorzoxazone ; NCZX, chlorzoxazone-N-glucuronide ; OCZX chlorzoxazone-O-glucuronide).

Tableau 1 : Données de validation intra et inter-jours de la méthode de dosage pour les différents métabolites de la CZX

Variabilité intra-jour						
Concentration μM	Echantillons de la gamme					
	3,12	6,25	12,5	25	50	100
6-hydroxychlorzoxazone (HCZX)	$t_R = 5,9\text{min}$		$R^2 = 0,999$		$LQ = 0,94\mu\text{M}$	
moyenne (n=5)	3,27	6,37	12,54	24,21	50,10	100,30
SD	0,03	0,04	0,07	0,50	0,13	0,10
RSD (%)	0,80	0,68	0,53	2,04	0,27	0,10
Justesse	104,90	101,97	100,30	96,84	100,20	100,23
Chlorzoxazone-O-glucuronide (OCZX)	$t_R = 3,8\text{min}$		$R^2 = 1$		$LQ = 0,65\mu\text{M}$	
moyenne (n=5)	3,35	6,36	12,53	24,06	49,84	100,30
SD	0,07	0,01	0,07	0,47	0,53	0,29
RSD (%)	2,06	0,21	0,51	1,96	1,06	0,29
Justesse	107,26	101,71	100,18	96,26	99,68	100,25
Chlorzoxazone-N-glucuronide (NCZX)	$t_R = 5,6\text{min}$		$R^2 = 0,999$		$LQ = 1,12\mu\text{M}$	
moyenne (n=5)	3,19	6,318	12,52	24,26	50,19	100,2
SD	0,019	0,06	0,01	0,037	0,12	0,39
RSD (%)	0,59	0,93	0,12	1,53	0,25	0,39
Justesse	102,17	101,09	100,17	97,05	100,38	100,21
Variabilité inter-jours						
Concentration μM	Echantillons de la gamme					
	3,12	6,25	12,5	25	50	100
6-hydroxychlorzoxazone (HCZX)						
moyenne (n=3)	3,342	6,492	12,29	24,72	50,17	99,84
SD	0,10	0,17	0,35	0,72	0,10	0,65
RSD (%)	2,88	2,57	2,88	2,92	0,2	0,65
Justesse	107,12	103,87	98,32	98,88	100,34	99,84
Chlorzoxazone-O-glucuronide (OCZX)						
moyenne (n=3)	3,39	6,50	12,32	24,68	49,99	99,97
SD	0,06	0,20	0,30	0,88	0,21	0,47
RSD (%)	1,71	3,07	2,41	3,55	0,41	0,47
Justesse	108,62	103,98	98,56	98,72	99,98	99,97
Chlorzoxazone-N-glucuronide (NCZX)						
moyenne (n=3)	3,238	6,508	12,28	24,93	50,11	99,69
SD	0,07	0,20	0,33	0,46	0,07	0,34
RSD (%)	229,00%	3,1	2,71	1,84	0,14	0,34
Justesse	103,78	104,13	98,24	99,72	100,22	99,69

Cette méthode a satisfait à tous nos critères d'évaluation et a été utilisée pour doser l'activité du CYP2E1 sur nos modèles cellulaires.

1.3.4. Métabolisme de la chlorzoxazone

➤ Incubation avec la CZX

Dans les cellules HepG2 recombinantes HepG2-CYP2E1 (figure 5a), l'**HCZX** visible dès 60 minutes d'incubation représente le métabolite principal de la CZX. La forme O-glucuronidée **OCZX**, marginale dans ce modèle, est visible à partir de 120 minutes. De même, le métabolite N-glucuronidé **NCZX** n'est pas détectable.

Pour HepaRG, la forme N-glucuronidée **NCZX** apparaît de manière similaire dans les deux modèles, sauvage et recombinant. Si le pic d'**OCZX** est visible dans les deux modèles, il est fortement augmenté dans le modèle recombinant.

Pour les hépatocytes humains, le pic de N-glucuronide est bien présent, mais moins que pour les cellules HepaRG, et l'apparition du O-glucuronide est semblable à celle observée dans le modèle HepaRG recombinant (figure 6).

La figure 5b résultant de la conversion des AUC (*area under the curve*) des différents pics des chromatogrammes représente l'accumulation dans le milieu des différents métabolites au cours de l'incubation. Pour les cellules HepG2 déficientes en UGT, l'**HCZX** peut s'accumuler. En revanche pour les modèles HepaRG, seules les formes glucuronidées sont visibles et le statut en CYP2E1 du modèle semble n'influencer que la forme **OCZX**.

La figure 7 présente les vitesses d'apparition des différents métabolites de la **CZX** pour les différents modèles utilisés :

✓ Formation de l'**HCZX** (figure 7a)

Les hépatocytes humains ont une activité enzymatique apparente du CYP2E1 proche de celle des HepaRG recombinants et relativement faible en regard du modèle HepG2. Les valeurs obtenues pour le modèle HepaRG étant inférieures ou proches de la limite de quantification, n'ont pas fait l'objet d'une analyse statistique.

✓ Formation de l'**OCZX** (figure 7b)

Les cellules HepG2 présentent l'activité la plus faible. Le modèle HepaRG recombinant présente une activité identique au hépatocytes humains et significativement plus élevée que le modèle HepaRG sauvage.

✓ Formation de la **NCZX** (figure 7c)

A l'exception du modèle HepG2 caractérisé par une absence de N-glucuronidation, l'activité est similaire dans les lignées HepaRG. Les hépatocytes humains présentent une activité inférieure à celle des HepaRG

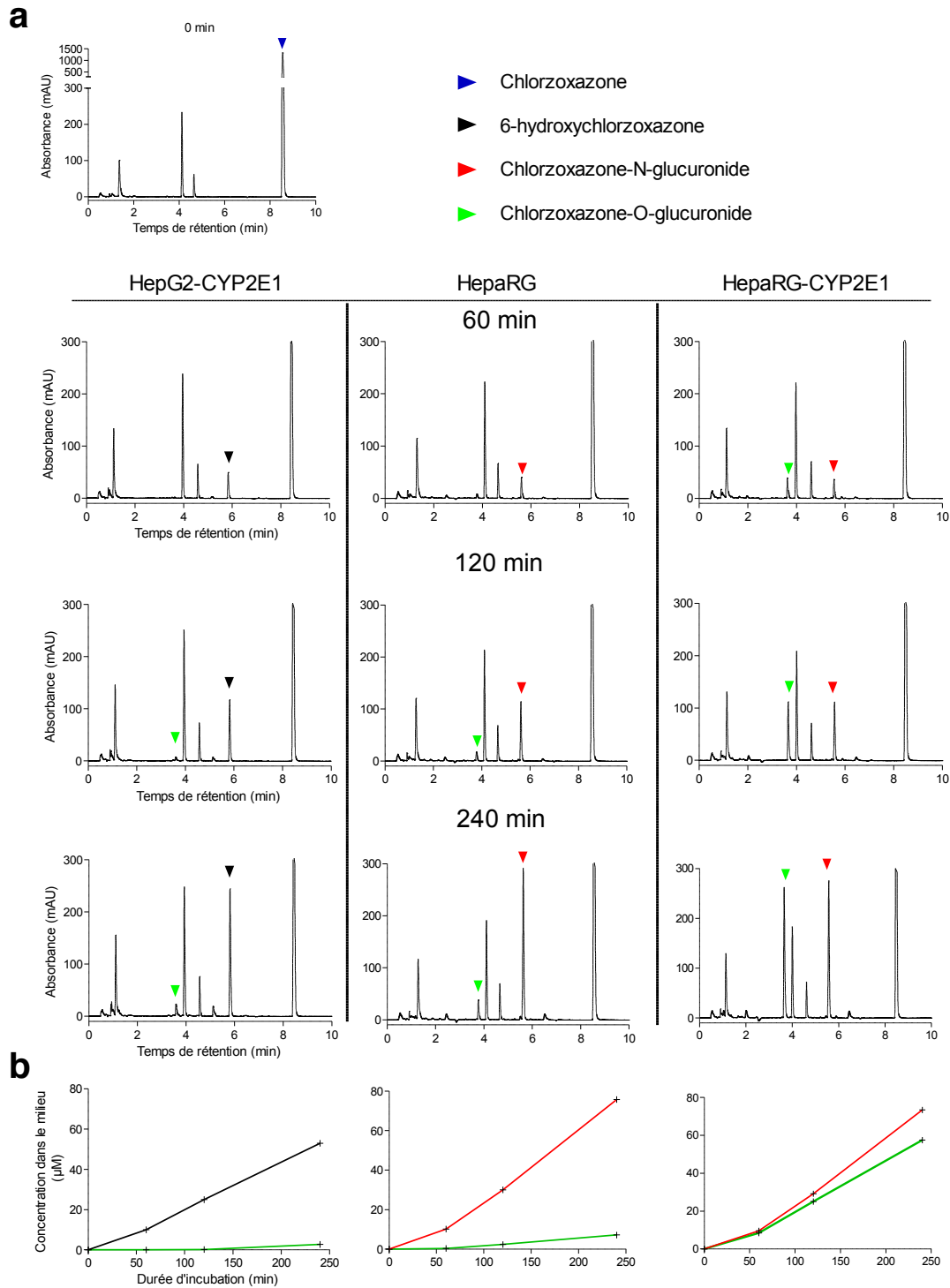


Figure 5 : Métabolisme de la CZX au sein des lignées HepG2 et HepaRG sauvage et recombinante CYP2E1. (a) Chromatogrammes représentatifs après 60, 120 et 240 minutes

d'incubation avec la CZX. (b) Accumulation des différents métabolites au cours de l'incubation.

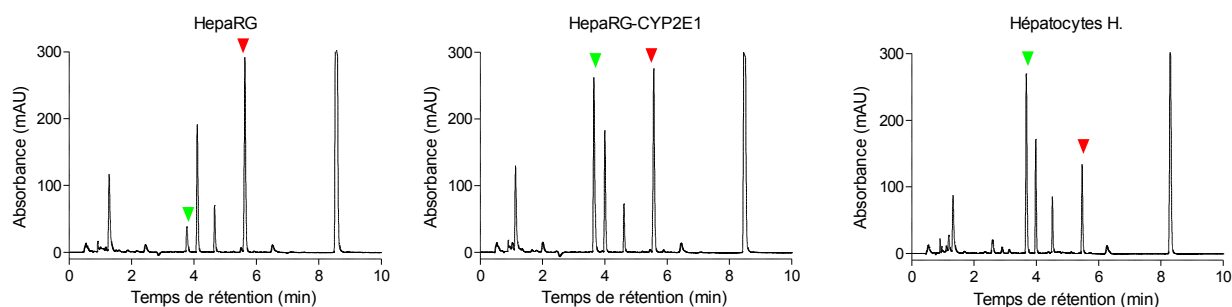


Figure 6 : Comparaison des profils chromatographiques d'hépatocytes humains, de cellules HepaRG et HepaRG-CYP2E1 après 240 minutes d'incubation avec la CZX.

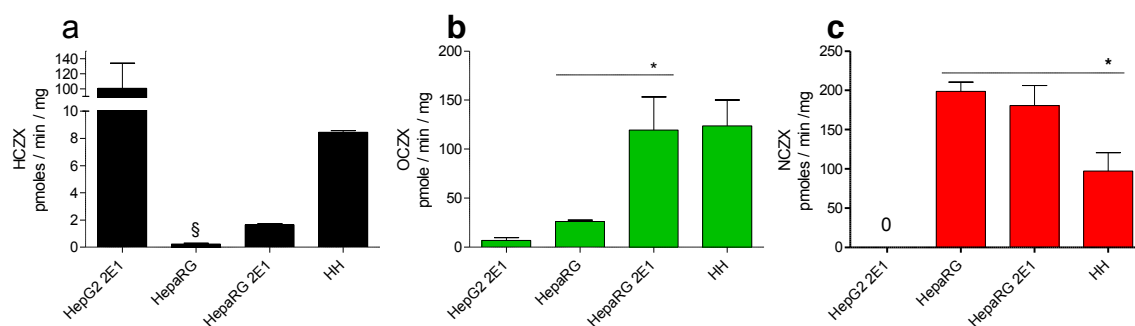


Figure 7 : Vitesse de formation des métabolites de la CZX au sein des modèles hépatocytaires. (test de student *.p < 0,05.)

Ces résultats, et en particulier la différence de O-glucuronidation obtenue entre les lignées HepaRG parentale et HepaRG CYP2E1, confortent l'hypothèse selon laquelle l'**OCZX** est un métabolite secondaire de l'**HCZX**. A partir de la **CZX**, son apparition serait donc dépendante d'une transformation préalable par le CYP2E1 en **HCZX**. De plus, nous démontrons la formation du métabolite N-glucuronidé dans les deux lignées HepaRG et dans les hépatocytes humains. Ce métabolite est abondamment formé dans tous nos modèles hépatocytaires à l'exception du modèle HepG2 où il est absent.

➤ Incubation avec l'**HCZX**

Afin de vérifier que la formation de l'**OCZX** est bien dépendante de la formation de l'**HCZX** et donc de l'activité CYP2E1, nous avons incubé nos cellules directement avec l'**HCZX** et établi la cinétique de formation de l'**OCZX**.

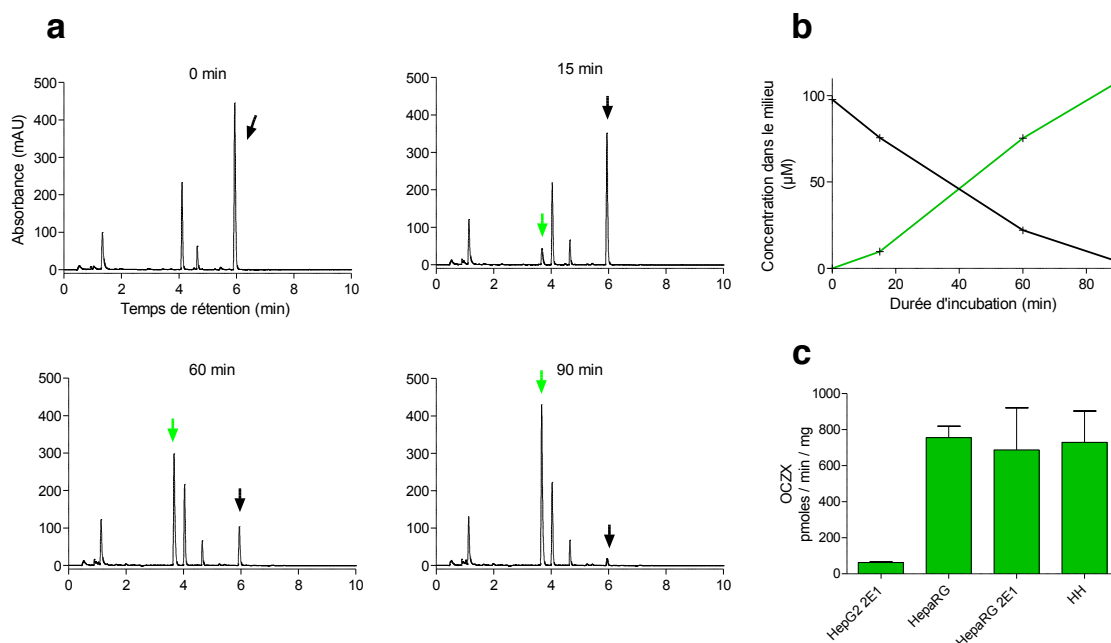


Figure 8 : O-glucuronidation de l'HCZX (a) Chromatogramme représentatif du modèle HepaRG après 15, 60 et 90 minutes d'incubation avec l'HCZX (100 µM). (b) Concentration de l'HCZX et du O-glucuronide en fonction de la durée d'incubation (c) Vitesse de O-glucuronidation pour les différents modèles hépatocytaires.

Les chromatogrammes représentatifs du modèle HepaRG présentés en figure 8a montrent une consommation très rapide de l'HCZX avec, en parallèle, l'apparition d'un pic d'OCZX. A 90 minutes, les 100 µM d'HCZX de départ sont réduits à l'état de traces dans le milieu. La figure 8b permet de visualiser le parallèle entre la disparition de l'HCZX et l'apparition de l'OCZX. Le ratio proche de 1 confirme qu'en seulement 90 minutes la totalité de l'HCZX est transformée en OCZX. La capacité de O-glucuronidation mesurée à partir de l'HCZX est indépendante de l'activité du CYP2E1, ce qui explique qu'aucune différence n'est perceptible entre les cellules parentales HepaRG et les cellules HepaRG recombinantes. De plus, cette activité est très supérieure à celle retrouvée lors de l'incubation avec la CZX car l'activité du CYP2E1 constituait alors le facteur limitant. Excepté pour les cellules HepG2 déficientes en UGTs, l'activité de O-glucuronidation est proche de 700 pmoles.min.mg pour tous les autres modèles.

Nous avons montré (figure 1) que la surexpression du CYP2E1 dans les cellules HepG2 augmente de manière significative la formation d'HCZX dans le milieu. Cependant, au sein de

cellules exprimant les UGTs, l'**HCZX** reste un métabolite peu abondant dont la demi-vie particulièrement courte résulte d'une activité de O-glucuronidation considérable.

➤ **Inhibition des UGTs**

Si l'utilisation du dosage de l'**HCZX** peut être pertinente pour rapporter l'activité CYP2E1 de certains modèles cellulaires déficients en UGT, il est probable qu'une modification de l'expression ou de l'activité des UGTs dans les hépatocytes humains ou cellules HepaRG puisse moduler la demi-vie de l'**HCZX** et par conséquent, l'activité CYP2E1 apparente.

Pour le vérifier nous avons mesuré la O-glucuronidation de l'**HCZX** et la 6-hydroxylation de la CZX en présence d'un inhibiteur des enzymes de phase II, le pentachlorophénol (PCP) (Boström et al., 2000).

Les chromatogrammes présentés en figure 9a montrent une inhibition de la formation des glucuronides issues de la CZX. La N-glucuronidation est inhibée dès les plus faibles doses. En revanche, la O-glucuronidation semble nécessiter une dose plus élevée d'inhibiteur. À l'exception du modèle HepG2 dans lequel la formation d'**HCZX** est stable, on observe une augmentation progressive de la formation d'**HCZX** pour des doses croissantes d'inhibiteur (figure 9b). De même, lors de l'incubation avec l'**HCZX**, une inhibition progressive de la O-glucuronidation est visible (figure 9c)

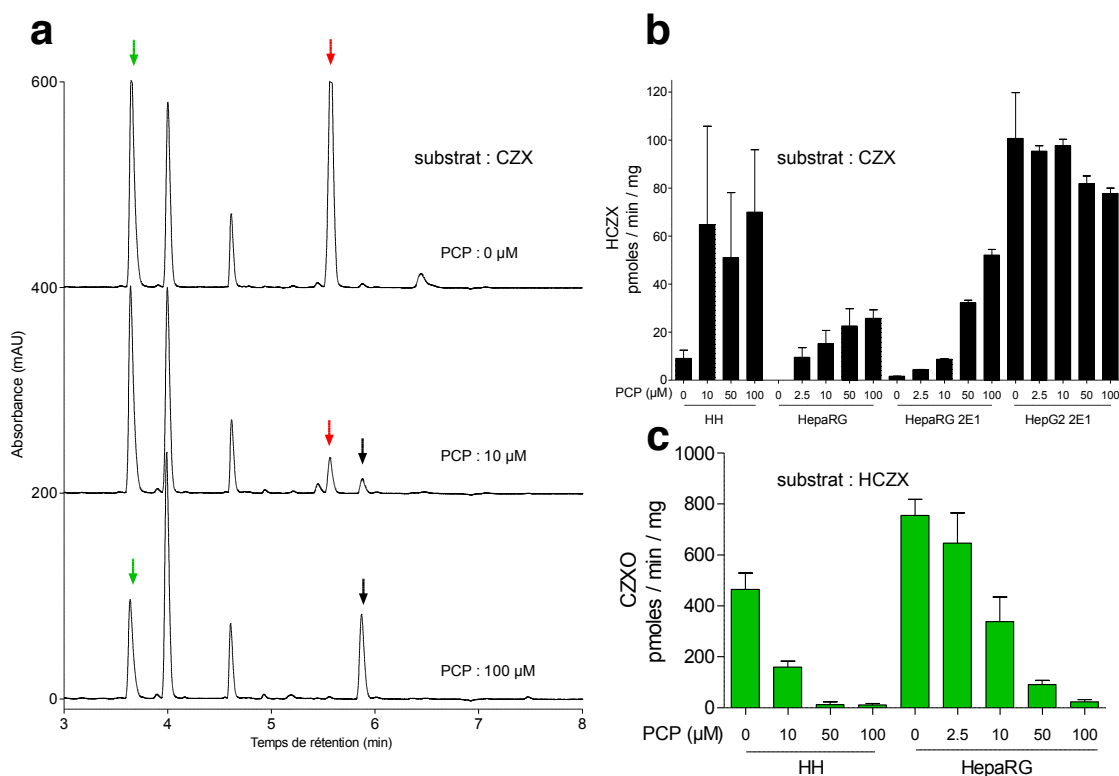


Figure 9 : Inhibition de la glucuronidation de la chlorzoxazone. (a) Chromatogrammes représentatifs métabolisme de la CZX dans les cellules HepaRG-CYP2E1 après 240 minutes d'incubation en présence ou non de PCP (0, 10, 100 µM). (b) Vitesse de formation de l'HCZX. (c) Vitesse d'apparition du O-glucuronide.

1.4. Discussion

Le CYP2E1 est impliqué dans l'activation métabolique d'une grande quantité de procarcinogènes tels que le NDMA et le benzène. Ce CYP induit par l'alcool, est également responsable de la formation de métabolites réactifs comme cela est le cas avec le paracétamol. Il est aussi à l'origine d'un stress oxydatif qui, en conditions physiopathologiques où le CYP2E1 est induit (diabète de type II, obésité), est associé au développement de maladies hépatiques telles que la stéatohépatite non-alcoolique. Ainsi, l'élévation de l'expression du CYP2E1 semblant prédisposer aux maladies hépatiques, il est nécessaire d'avoir des sondes spécifiques permettant de quantifier son activité *in vivo* et *in vitro*. Cependant, pour que ces molécules soient utilisables chez l'Homme, leur toxicité doit être la plus faible possible. A l'heure actuelle, seule la CZX semble répondre à ces critères.

Nos travaux avaient initialement pour objectif de caractériser l'expression du CYP2E1 dans le modèle HepaRG et HepG2 et si nécessaire, de les adapter en créant des modèles recombinants surexprimant ce CYP. En effet, la variabilité d'expression du CYP2E1 dans le modèle HepG2 en fonction de son origine ainsi que la variabilité des données concernant l'activité du CYP2E1 dans le modèle HepaRG ont nécessité une clarification.

Nous avons montré que la surexpression du CYP2E1 dans les cellules HepG2 leur confère une importante capacité d'hydroxylation de la CZX. Comparativement, l'activité apparente du modèle HepaRG recombinant semblait très faiblement augmentée. Pour expliquer cette différence, nous avons émis deux hypothèses. La première, s'appuyant sur les travaux de Oesch-Bartlomowicz et al. (1998), avançait qu'un statut en AMPc et/ou que l'activité basale de la protéine kinase A pouvaient différer entre nos modèles et être à l'origine de cette différence d'activité. Cependant, le rôle possible des UGTs dans le métabolisme de l'HCZX semblait plus à même d'expliquer cette disparité et nous a poussés à déterminer le profil d'expression des UGTs dans nos modèles. Nous avons ainsi montré que la lignée HepaRG exprime la plupart des UGTs à des niveaux similaires aux hépatocytes humains, à contrario des cellules HepG2.

Le développement d'une méthode de dosage prenant en compte les métabolites de phase II de la chlorzoxazone nous a permis de démontrer que la totalité de l'HCZX est conjuguée sous forme de O-glucuronide. L'activité de O-glucuronidation déterminée lors d'une incubation directe avec l'HCZX étant bien supérieure à celle déterminée lors d'une incubation avec la CZX démontre que l'activité du CYP2E1 est le facteur limitant dans la formation du O-glucuronide. De plus, nous avons été capables de modifier l'activité CYP2E1 apparente en modulant la O-glucuronidation à l'aide du PCP et nous avons montré que la CZX peut être directement conjuguée sous forme de N-glucuronide. Pris ensemble, ces résultats soulignent la nécessité de prendre en compte l'influence du métabolisme de phase II lors de l'utilisation de la chlorzoxazone.

Le dosage de l'HCZX peut cependant être approprié dans certains modèles dépourvus d'activité de conjugaison comme dans le cas de la lignée HepG2. Cependant, dans les modèles plus pertinents d'un point de vue toxicologique, tels que les hépatocytes humains et les cellules HepaRG, l'HCZX est un intermédiaire métabolique dont la présence semble être plus tributaire de l'activité des UGTs que de celle du CYP2E1 lui-même. En effet, dans le modèle HepaRG, la surexpression du CYP2E1 permet d'augmenter d'un facteur 4 l'activité

CYP2E1 apparente (Figure 1b) alors que l'inhibition des UGTs dans le modèle sauvage l'augmente d'un facteur 50 (figure 9b).

In vitro, lors de l'utilisation de CZX sur microsomes, il est probable que la conjugaison de celle-ci soit fortement atténuée voire nulle, d'où de la nécessité de rajouter l'UDPGA et l'alaméthicine au milieu réactionnel. L'alaméthicine est un peptide permettant la formation de pores membranaires. Il favoriserait l'accessibilité de l'UGT au substrat et à l'UDPGA (Uridine Diphosphate Glucuronique Acid) avec l'UGT qui est orientée vers la lumière du réticulum à l'inverse des CYPs (Walsky et al., 2012). Sur cellules, l'effet observé sur l'activité apparente du CYP2E1 dépendra de la régulation des UGTs et du CYP2E1 et si elles vont de paire ou non dans le contexte d'étude.

Le CYP2E1 étant induit dans le diabète de type 2, l'obésité, le jeûne et la consommation d'alcool, il fait souvent l'objet d'études dans des modèles mimant ces conditions (exposition à l'alcool ou à la streptozotocine pour le diabète, régime hyperlipidique, restriction calorique). A l'exception de Brill et al., (2012), aucune étude ne s'est intéressée simultanément à la régulation du CYP2E1 et des UGTs dans ces pathologies. Cette méta-analyse rapporte que les drogues conjuguées par les UGTs ou métabolisées par le CYP2E1 ont une clairance généralement augmentée en contexte d'obésité. D'autres études rapportent également une induction des UGTs dans des modèles d'obésité, de jeun et de diabète (Xie et al., 2013; Xu, Kulkarni, Li, & Slitt, 2012) à l'exception de Dostalek et al. (2011), montrant une inhibition du CYP2B7 hépatique chez l'individu diabétique. L'alcool semble également induire les UGTs (Kardon et al., 2000; Li et al., 2000). Malgré quelques contradictions, ces résultats indiquent dans l'ensemble, que la régulation des UGTs semble suivre celle du CYP2E1. Dans ces conditions, l'activité apparente du CYP2E1 sur cellule serait sous-estimée.

Déterminer l'activité du CYP2E1 à partir de matrices biologiques comme l'urine et le sérum est plus complexe. La nécessité d'utiliser la β -glucuronidase semble être admise dans la communauté scientifique mais les conditions d'hydrolyse sont variables d'une publication à l'autre (Frye et al., 1996; Lucas et al., 1993; Piccoli et al., 2010). Elle permet en théorie de libérer la CZX et l'HCZX de l'acide glucuronique avant de réaliser le dosage. Ces études interprètent ensuite la clairance plasmatique de la CZX, le ratio métabolique (HCZX/CZX) et la fraction d'HCZX retrouvée dans les urines.

Nous avons réalisé au laboratoire quelques travaux en vue d'adapter notre dosage au sérum. Les résultats préliminaires montrent une efficacité d'hydrolyse de l'OCZX en CZX proche de 100% avec une β -glucuronidase. Dans ce cas, l'utilisation de la fraction urinaire d'HCZX retrouvée dans les urines peut constituer un bon indicateur de l'activité du CYP2E1, d'autant plus que les rendements d'extraction (extraction en phase solide ou liquide-liquide) que nous avons obtenus à partir du sérum sont plus élevés pour l'HCZX que pour son glucuronide (résultats non présentés). A l'inverse, le N-glucuronide s'est montré totalement résistant à la digestion par la β -glucuronidase, confirmant les travaux de Frandsen (2007) et Zenser (1999). Ces derniers soulignant la susceptibilité de certains N-glucuronides à l'hydrolyse acide, il pourrait être intéressant de vérifier la stabilité de la NCZX dans les urines, même si aucune étude ne rapporte la présence de CZX dans cette matrice. L'existence de ce N-glucuronide pourrait expliquer l'absence de corrélation entre le ratio métabolique et la fraction urinaire observée dans les travaux de Ernstgård et al., (2004).

Ainsi, une augmentation de la N-glucuronidation peut augmenter le ratio métabolique (HCZX/CZX) et la clairance plasmatique de la CZX indépendamment de l'activité du CYP2E1.

L'utilisation de la chlorzoxazone afin de rapporter l'activité du CYP2E1 *in vitro* devrait à minima être faite en regard de l'expression des UGTs dans le modèle concerné. Dans l'idéal, le O-glucuronide devrait être considéré comme résultant de l'activité CYP2E1 et cumulé avec l'HCZX formée pour permettre l'obtention d'une mesure fiable. D'une manière générale, le métabolisme de phase II devrait être systématiquement considéré avant la réalisation d'une étude d'activité sur les CYPs.

Finalement, le modèle HeparG semble être un modèle de choix pour l'étude du CYP2E1 (Turpeinen et al., 2009).

1.4.1. Perspectives

L'identification des UGTs impliquées dans la formation du O et du N-glucuronide de la CZX fait actuellement partie de nos objectifs à court terme. A l'aide de siRNA, nous avons déjà réalisé quelques expériences préliminaires dont les résultats sont encore peu concluants. Il est probable que plusieurs UGTs soient impliquées dans ce métabolisme et que l'absence d'inhibition par les siRNA isolément puisse être corrigée par l'utilisation de siRNA en mélange. Nous avons malgré tout réfléchi à d'autres stratégies permettant de répondre à

cette question telles que l'utilisation de microsomes recombinants ou la création de lignée recombinantes UGT dérivées du modèle HepG2.

Nous voulons également adapter la méthode de dosage HPLC-UV au sérum humain pour mettre en évidence l'existence de la NCZX et pouvoir mesurer directement l'OCZX. Pour cela, nous souhaitons avec une seule procédure d'extraction, isoler la CZX, l'HCZX et les deux glucuronides pour un dosage simultané en HPLC-UV. Le centre de ressource biologique de Rennes a mis à notre disposition une sérothèque issue d'une étude clinique évaluant l'impact de la saignée sur l'activité du CYP2E1 et les marqueurs de stress oxydatifs (Lainé et al., 2006).

Bibliographie (article 3)

- Ahn, C. Y., Kim, E. J., Lee, I., Kwon, J. W., Kim, W. B., Kim, S. G., & Lee, M. G. (2003). Effects of glucose on the pharmacokinetics of intravenous chlorzoxazone in rats with acute renal failure induced by uranyl nitrate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92(8), 1604–13. doi:10.1002/jps.10426
- Aninat, C., Glaise, D., Charpentier, T. Le, Langou, S., Morel, F., & Guguen-guillouzo, C. (2006). EXPRESSION OF CYTOCHROMES P450 , CONJUGATING ENZYMES AND NUCLEAR RECEPTORS IN HUMAN HEPATOMA HepaRG CELLS ' Guillouzo ABSTRACT :, 34(1), 75–83. doi:10.1124/dmd.105.006759.other
- Anthérieu, S., Chesné, C., Li, R., Camus, S., Lahoz, A., Picazo, L., ... Guillouzo, A. (2010). Stable expression, activity, and inducibility of cytochromes P450 in differentiated HepaRG cells. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 38(3), 516–25. doi:10.1124/dmd.109.030197
- Bock, K. W. (2010). Functions and transcriptional regulation of adult human hepatic UDP-glucuronosyltransferases (UGTs): Mechanisms responsible for interindividual variation of UGT levels. *Biochemical Pharmacology*, 80, 771–777. doi:10.1016/j.bcp.2010.04.034
- Boström, M., L DePierre, J. W. (2000). Conjugation of 1-naphthol in primary cell cultures of rat ovarian cells. *Chemico-Biological Interactions*, 124(2), 103–118. doi:10.1016/S0009-2797(99)00148-9
- Brill, M. J. E., Diepstraten, J., van Rongen, A., van Kralingen, S., van den Anker, J. N., & Knibbe, C. A. J. (2012). Impact of obesity on drug metabolism and elimination in adults and children. *Clinical Pharmacokinetics*, 51(5), 277–304. doi:10.2165/11599410-000000000-00000
- Cederbaum, A. I. (2006). Cytochrome P450 2E1-dependent oxidant stress and upregulation of anti-oxidant defense in liver cells. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 21 Suppl 3, S22–5. doi:10.1111/j.1440-1746.2006.04595.x
- Chen, Q., Cederbaum, A. I. (1998). Cytotoxicity and apoptosis produced by cytochrome P450 2E1 in Hep G2 cells. *Molecular Pharmacology*, 53(4), 638–48.
- Court, M. H., Von Moltke, L. L., Shader, R. I., & Greenblatt, D. J. (1997). Biotransformation of chlorzoxazone by hepatic microsomes from humans and ten other mammalian species. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 18(3), 213–26.
- Dostalek, M., Court, M. H., Hazarika, S., & Akhlaghi, F. (2011). Diabetes Mellitus Reduces Activity of Human UDP- Glucuronosyltransferase 2B7 in Liver and Kidney Leading to Decreased Formation of Mycophenolic

- Acid Acyl- Glucuronide Metabolite. *Drug Metabolism and Disposition the Biological Fate of Chemicals*, 39(3), 448–455. doi:10.1124/dmd.110.036608.either
- Elsohly, M. A., Gul, W., Feng, S., & Murphy, T. P. (2005). Hydrolysis of conjugated metabolites of buprenorphine II. The quantitative enzymatic hydrolysis of norbuprenorphine-3-beta-D-glucuronide in human urine. *Journal of Analytical Toxicology*, 29(6), 570–3.
- Ernstgård, L., Warholm, M., & Johanson, G. (2004). Robustness of chlorzoxazone as an in vivo measure of cytochrome P450 2E1 activity. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 58(2), 190–200. doi:10.1111/j.1365-2125.2004.02132.x
- Frandsen, H. (2007). Deconjugation of N-glucuronide conjugated metabolites with hydrazine hydrate-- biomarkers for exposure to the food-borne carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 45(5), 863–70. doi:10.1016/j.fct.2006.11.006
- Fromenty, B. (2013). Drug-induced liver injury in obesity. *Journal of Hepatology*, 58(4), 824–6. doi:10.1016/j.jhep.2012.12.018
- Frye, R. F., Stiff, D. D. (1996). Determination of chlorzoxazone and 6-hydroxychlorzoxazone in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Applications*, 686(2), 291–6.
- Gerbal-chaloin, S., Dumé, A., Briolotti, P., Klieber, S., Raulet, E., Duret, C., ... C, U. S. G. (2014). The WNT / b - Catenin Pathway Is a Transcriptional Regulator of CYP2E1 , CYP1A2 , and Aryl Hydrocarbon Receptor Gene Expression in Primary Human Hepatocytes, (December), 624–634.
- Gorski, J. C., Jones, D. R., Wrighton, S. a, Hall, S. D. (1997). Contribution of human CYP3A subfamily members to the 6-hydroxylation of chlorzoxazone. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, 27, 243–256. doi:10.1080/004982597240578
- Guillouzo, A., Corlu, A., Aninat, C., Glaise, D., Morel, F., & Guguen-Guillouzo, C. (2007). The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chemico-Biological Interactions*, 168(1), 66–73. doi:10.1016/j.cbi.2006.12.003
- Hewitt, N. J., & Hewitt, P. (2004). Phase I and II enzyme characterization of two sources of HepG2 cell lines. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, 34(3), 243–56. doi:10.1080/00498250310001657568
- Kardon, T., Coffey, M. J., Bánhegyi, G., Conley, A. A., Burchell, B., Mandl, J., & Braun, L. (2000). Transcriptional induction of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase by ethanol in rat liver. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 21(3), 251–7.
- Kim, Y. C., Kim, Y. G., Kim, E. J., Cho, M. K., Kim, S. G., & Lee, M. G. (2003). Pharmacokinetics of intravenous chlorzoxazone in rats with dehydration and rehydration: effects of food intakes. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 24(2), 53–61. doi:10.1002/bdd.335
- Knockaert, L., Fromenty, B., & Robin, M.-A. (2011). Mechanisms of mitochondrial targeting of cytochrome P450 2E1: physiopathological role in liver injury and obesity. *The FEBS Journal*, 278(22), 4252–60. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08357.x
- Lainé, F., Reymann, J. M., Morel, F., Langouët, S., Perrin, M., Guillygomarc'h, a, ... Deugnier, Y. (2006). Effects of phlebotomy therapy on cytochrome P450 2e1 activity and oxidative stress markers in dysmetabolic iron overload syndrome: a randomized trial. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 24(8), 1207–13. doi:10.1111/j.1365-2036.2006.03116.x

- Leclercq, I., Horsmans, Y., Desager, J.-P. (1998). Estimation of chlorzoxazone hydroxylase activity in liver microsomes and of the plasma pharmacokinetics of chlorzoxazone by the same high-performance liquid chromatographic method. *Journal of Chromatography A*, 828, 291–296. doi:10.1016/S0021-9673(98)00588-3
- Li, Y. Q., Prentice, D. A., Howard, M. L., Mashford, M. L., Wilson, J. S., & Desmond, P. V. (2000). Alcohol up-regulates UDP-glucuronosyltransferase mRNA expression in rat liver and in primary rat hepatocyte culture. *Life Sciences*, 66(7), 575–84.
- Lucas, D., Berthou, F., Girre, C., Poitrenaud, F., & Ménez, J. F. (1993). High-performance liquid chromatographic determination of chlorzoxazone and 6-hydroxychlorzoxazone in serum: a tool for indirect evaluation of cytochrome P4502E1 activity in humans. *Journal of Chromatography*, 622(1), 79–86.
- Mackenzie, P. I., Rogers, A., Treloar, J., Jorgensen, B. R., Miners, J. O., & Meech, R. (2008). Identification of UDP glycosyltransferase 3A1 as a UDP N-acetylglucosaminyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(52), 36205–10. doi:10.1074/jbc.M807961200
- Mehvar, R., Vuppugalla, R. (2006). Hepatic disposition of the cytochrome P450 2E1 marker chlorzoxazone and its hydroxylated metabolite in isolated perfused rat livers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95(7), 1414–24. doi:10.1002/jps.20503
- O'Shea, D., Davis, S. N., Kim, R. B., & Wilkinson, G. R. (1994). Effect of fasting and obesity in humans on the 6-hydroxylation of chlorzoxazone: a putative probe of CYP2E1 activity. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 56(4), 359–67.
- Oesch-Bartlomowicz, B., Padma, P. R., Becker, R., Richter, B., Hengstler, J. G., Freeman, J. E., ... Oesch, F. (1998). Differential modulation of CYP2E1 activity by cAMP-dependent protein kinase upon Ser129 replacement. *Experimental Cell Research*, 242, 294–302. doi:10.1006/excr.1998.4120
- Ono, S., Hatanaka, T., Hotta, H., Tsutsui, M., Satoh, T., & Gonzalez, F. J. (1995). Chlorzoxazone is metabolized by human CYP1A2 as well as by human CYP2E1. *Pharmacogenetics*, 5(3), 143–50.
- Peter, R., Böcker, R., Beaune, P. H., Iwasaki, M., Guengerich, F. P., & Yang, C. S. Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P-450IIE1. *Chemical Research in Toxicology*, 3(6), 566–73.
- Piccoli, P., Carrieri, M., Padovano, L., Di Mare, M., Bartolucci, G. B., Fracasso, M. E., ... Manno, M. (2010). In vivo CYP2E1 phenotyping as a new potential biomarker of occupational and experimental exposure to benzene. *Toxicology Letters*, 192, 29–33. doi:10.1016/j.toxlet.2009.10.023
- Taylor, J. I., Grace, P. B., & Bingham, S. A. (2005). Optimization of conditions for the enzymatic hydrolysis of phytoestrogen conjugates in urine and plasma. *Analytical Biochemistry*, 341(2), 220–9. doi:10.1016/j.ab.2005.03.053
- Turpeinen, M., Tolonen, A., Chesne, C., Guillouzo, A., Uusitalo, J., & Pelkonen, O. (2009). Functional expression, inhibition and induction of CYP enzymes in HepaRG cells. *Toxicology in Vitro*, 23(4), 748–753. doi:10.1016/j.tiv.2009.03.008
- Walsky, R. L., Bauman, J. N., Bourcier, K., Giddens, G., Lapham, K., Negahban, A., ... Goosen, T. C. (2012). Optimized assays for human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) activities: Altered alamethicin concentration and utility to screen for UGT inhibitors. *Drug Metabolism and Disposition*, 40, 1051–1065. doi:10.1124/dmd.111.043117
- Xie, H., Sun, S., Cheng, X., Yan, T., Zheng, X., Li, F., ... Hao, H. (2013). Dysregulations of Intestinal and Colonic UDP-glucuronosyltransferases in Rats with Type 2 Diabetes. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 28(5), 427–434. doi:10.2133/dmpk.DMPK-13-RG-020

- Xu, J., Kulkarni, S. R., Li, L., Slitt, A. L. (2012). UDP-glucuronosyltransferase expression in mouse liver is increased in obesity- and fasting-induced steatosis. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 40(2), 259–66. doi:10.1124/dmd.111.039925
- Zenser, T. V., Lakshmi, V. M., Davis, B. B. (1999). Human and Escherichia coli beta -Glucuronidase Hydrolysis of Glucuronide Conjugates of Benzidine and 4-Aminobiphenyl, and their Hydroxy Metabolites. *Drug Metab. Dispos.*, 27(9), 1064–1067.

5. Discussion

Dans notre société, l'intérêt économique prime souvent sur les intérêts environnementaux et sanitaires. Ceci explique en grande partie pourquoi l'activité anthropique est la principale pour ne pas dire l'unique source de contamination de l'environnement.

Prenons l'exemple du diesel, alors que celui-ci est interdit sur les véhicules de tourisme dans de nombreux pays, en France le parc automobile diesel représentait plus 72,5 % en 2012. Cette spécificité française est d'abord historique, puisqu'elle a été favorisée au travers d'avantages fiscaux dès l'après-guerre et encouragée par les chocs pétroliers successifs. La dangerosité plus élevée des rejets des moteurs Diesel en regard de ceux de leurs homologues à essence était initialement ignorée mais est aujourd'hui bien établie. En 1988, les gaz d'échappement de diesel étaient considérés comme étant probablement cancérogènes pour l'Homme (groupe 2A, classification IARC). Depuis 2012, ils sont classés comme cancérogènes pour l'Homme (groupe 1) ; malgré tout, le diesel fait toujours l'objet d'avantages favorisant son expansion.

L'acrylamide est un composé fréquemment utilisé sous forme de polymère dans le traitement des eaux usées, l'industrie papetière et cosmétique. Si la carcinogénicité du monomère est établie chez l'animal, aucune étude épidémiologique n'a pu démontrer ce lien chez l'Homme. Le polyacrylamide qui est également utilisé dans l'industrie du bâtiment pour l'étanchéification des structures a été à l'origine en 1997 d'un accident lors de la construction d'un tunnel en Suède. Suite à un défaut de polymérisation, l'acrylamide a contaminé les eaux de surface et les animaux d'élevage à proximité. Le dosage des adduits à l'hémoglobine qui sont un bon marqueur d'exposition à l'acrylamide a mis en évidence une forte exposition des animaux et des ouvriers du tunnel mais plus curieusement, il a permis de montrer que la population contrôle était également exposée. La présence de cet adduit au sein d'une population non exposée a permis de mettre en évidence la présence d'acrylamide dans l'alimentation. Depuis cet incident, la carcinogénicité de cette molécule est beaucoup plus étudiée et les procédés responsables de sa formation dans les aliments font l'objet d'études afin d'en limiter la production.

Ces deux exemples démontrent la nécessité de caractériser « a priori » les produits chimiques utilisés ou rejetés dans l'environnement. Ceci est particulièrement vrai dans

l'évaluation de la carcinogénicité qui nécessite des études longues mais souvent en opposition avec les intérêts des industriels.

Le manque de connaissance sur ces substances a conduit l'UE à lancer le programme REACH en vigueur depuis 2007. Celui-ci fait porter à l'industrie la responsabilité d'évaluer et de gérer les risques posés par les produits chimiques. Ce programme a favorisé le développement de nouvelles stratégies d'évaluation plus pertinentes et moins onéreuses pour évaluer la toxicité des produits chimiques.

C'est dans ce contexte que mes travaux de thèse ont été réalisés. Dans le cadre du projet ANR NISTEC, nous avons développé un test de génotoxicité haut débit sur la lignée hépatocytaire. Nos résultats ont démontré une nouvelle fois la nécessité d'utiliser un modèle exprimant les enzymes du métabolisme des xénobiotiques comme l'est le modèle HepaRG afin de détecter les génotoxiques directs et bio-activés. De plus, en adaptant les conditions de culture et de traitements du modèle HepaRG, nous avons été capables de mimer une exposition chronique sur 7 et 14 jours, une première sur modèle cellulaire *in vitro*.

Si d'un point de vue réglementaire la lignée HepaRG n'est pas encore reconnue, elle est cependant considérée comme prometteuse pour l'évaluation de la génotoxicité (Pfuhler et al. 2011). En parallèle de nos recherches, le modèle HepaRG est au centre de plusieurs projets visant à démontrer son intérêt dans l'évaluation génotoxique. Par exemple, le projet COMPACK s'inscrit dans une démarche similaire à la notre puisqu'il a pour but de proposer un test automatisé et haut débit basé sur le test des comètes et le modèle HepaRG (www.heparg.com). D'autres travaux ont pour objectif de faire reconnaître ce modèle vis-à-vis des tests réglementaires existants comme ceux de Le Hégarat et al., ayant récemment comparé le test des comètes au test des micronoyaux à l'aide des molécules recommandées par l'ECVAM (Kirkland et al. 2008; Le Hégarat et al. 2014). Ces 61 molécules sont subdivisées en 3 groupes, le premier (vrais positifs) est constitué des molécules génotoxiques et donc réactives vis-à-vis de l'ADN. Le second (vrais négatifs) est constitué de molécules non réactives vis-à-vis de l'ADN dont certaines sont carcinogènes mais ressortent négatives dans tous les tests habituels. Enfin, le troisième groupe inclut les molécules donnant des résultats douteux comme les substances non réactives vis-à-vis de l'ADN mais carcinogènes et

donnant des résultats positifs dans certains tests, ainsi que des molécules connues comme étant des faux positifs.

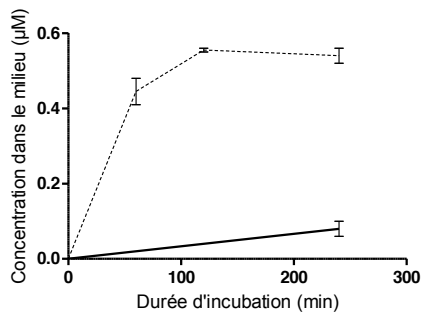
A terme, nous devrions également évaluer notre test vis-à-vis de ces molécules afin de situer plus précisément sa performance vis-à-vis des méthodes existantes.

Dans la seconde partie de ma thèse, nous avons développé des lignées recombinantes HepaRG exprimant la GFP sous le contrôle de plusieurs promoteurs des enzymes du métabolisme. En effet, une induction des EMXs peut favoriser la bioactivation des xénobiotiques et aboutir à une potentialisation de leur toxicité. Il est donc primordial d'avoir des systèmes permettant de prédire cet effet. Nous rapportons pour la première fois l'utilisation de cellules métaboliquement compétentes, le modèle HepaRG

L'analyse de l'induction par cytométrie limitant le débit de notre test, nous souhaitons l'adapter afin de permettre une analyse haut débit par imagerie de fluorescence. Dans le cadre d'une collaboration avec la plateforme ImpacCell, nous avons sélectionné une trentaine de molécules dont des contaminants environnementaux et des additifs alimentaires dans le but de les tester sur nos lignées.

Turpeinen et al. (2009) rapportaient que l'absence d'activité du CYP2E1 dans les cellules HepaRG constituait une limite potentielle de ce modèle. Nos travaux, à l'aide la chlorzoxazone, montrent au contraire que le modèle HepaRG est particulièrement proche des hépatocytes humains et confirme sa supériorité vis-à-vis de modèles comme HepG2.

Nous avons démontré que la seule substance utilisable chez l'Homme pour rapporter l'activité du CYP2E1 est également pertinente *in vitro* mais sous certaines conditions. En effet, la prise en compte des métabolites de phase II de la chlorzoxazone est nécessaire pour aboutir à une mesure fiable. Cependant, si le dosage exclusif de la 6-hydroxychlorzoxazone peut parfois apporter une information comme cela a été le cas lors de la comparaison de nos lignées HepaRG sauvage et recombinante, il semblerait comme le montre la figure suivante, que son accumulation dans le milieu ne soit permise seulement que jusqu'à un certain seuil. La probabilité d'une interaction enzyme-substrat conditionne probablement ce phénomène et démontre une nouvelle fois la versatilité de cette approche.



Accumulation de l'HCZX au cours de l'incubation avec la CZX. Modèle HepaRG (trait plein) et HepaRG recombinant (trait pointillé) Ces résultats ne sont donnés qu'à titre d'illustration, les concentrations dosées sont inférieures à la limite de quantification.

A l'aide du modèle HepaRG, nous avons également réalisé quelques expériences avec le *p*-nitrophénol qui pourrait être une bonne alternative *in vitro*. Nous avons observé un métabolisme alternatif au CYP2E1 important, limitant très rapidement sa disponibilité vis-à-vis du CYP2E1. Les autres molécules pouvant être utilisées pour rapporter l'activité du CYP2E1 telles que l'aniline, le *p*-nitrophénol et le NDMA sont non seulement des toxiques mais présentent un métabolisme de phase II plus complexe que celui de la chlorzoxazone (Karakurt et al. 2013; Yue et al. 2009; Dicker et al., 1990; El-Bachá et al., 2000; Manevski et al., 2015; Rugstad et al., 1975)

Nos travaux ont démontré que seuls deux métabolites alternatifs à la 6-hydroxychlorzoxazone sont produits, le O- et le N-glucuronide. Dans ces conditions, la chlorzoxazone semble être la sonde la plus appropriée pour rapporter l'activité du CYP2E1.

Au cours de ma thèse, nous avons développé deux nouveaux outils pour l'évaluation toxicologique des xénobiotiques. Le premier permet d'évaluer en simultanément la viabilité et la génotoxicité au travers de la phosphorylation des histones. Le second permet d'identifier les xénobiotiques ou métabolites capable d'induire les EMXs. Nous rapportons pour la première fois l'utilisation de la lignée HepaRG dans le cadre de tests toxicologiques haut débit et permettant de mimer une exposition chronique.

Le modèle HepaRG est considéré comme la lignée cellulaire se rapprochant le plus des hépatocytes humains en termes d'expression des EMXs. Cependant, la pertinence de ce modèle concernant l'étude du CYP2E1 était sujette à caution. Nous avons montré à l'aide de la chlorzoxazone, que le profil métabolique des HepaRG est en réalité très proche des hépatocytes humains. Nous avons mis en évidence que le dosage de l'HCZX classiquement utilisé dans la plupart des études peut être responsable d'un biais important. Nous

proposons ainsi une méthode permettant de rapporter l'activité du CYP2E1 de manière fiable quel que soit le niveau d'expression des enzymes de phase II dans le modèle étudié.

6. Bibliographie

- Abdelmegeed, Mohamed A, Atrayee Banerjee, Sehwan Jang, Seong-Ho Yoo, Jun-Won Yun, Frank J Gonzalez, Ali Keshavarzian, and Byoung-Joon Song. 2013. "CYP2E1 Potentiates Binge Alcohol-Induced Gut Leakiness, Steatohepatitis, and Apoptosis." *Free Radical Biology & Medicine* 65 (December): 1238–45. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.09.009.
- Abdel-Razzak, Z, P Loyer, A Fautrel, J C Gautier, L Corcos, B Turlin, P Beaune, and A Guillouzo. 1993. "Cytokines down-Regulate Expression of Major Cytochrome P-450 Enzymes in Adult Human Hepatocytes in Primary Culture." *Molecular Pharmacology* 44 (4): 707–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8232220>.
- Addya, S, H K Anandatheerthavarada, G Biswas, S V Bhagwat, J Mullick, and N G Avadhani. 1997. "Targeting of NH₂-Terminal-Processed Microsomal Protein to Mitochondria: A Novel Pathway for the Biogenesis of Hepatic Mitochondrial P450MT₂." *The Journal of Cell Biology* 139 (3). UNITED STATES: 589–99.
- Adler, Sarah, David Basketter, Stuart Creton, Olavi Pelkonen, Jan van Benthem, Valérie Zuang, Klaus Ejner Andersen, et al. 2011. "Alternative (non-Animal) Methods for Cosmetics Testing: Current Status and Future Prospects-2010." *Archives of Toxicology* 85 (5): 367–485. doi:10.1007/s00204-011-0693-2.
- Aguiar, Mike, Robert Masse, and Bernard F Gibbs. 2005. "Regulation of Cytochrome P450 by Posttranslational Modification." *Drug Metabolism Reviews* 37 (2). United States: 379–404. doi:10.1081/DMR-46136.
- Ahn, K, E Szczesna-Skorupa, and B Kemper. 1993. "The Amino-Terminal 29 Amino Acids of Cytochrome P450 2C1 Are Sufficient for Retention in the Endoplasmic Reticulum." *The Journal of Biological Chemistry* 268 (25). UNITED STATES: 18726–33.
- Aitken, Alison E, and Edward T Morgan. 2007. "Gene-Specific Effects of Inflammatory Cytokines on Cytochrome P450 2C, 2B6 and 3A4 mRNA Levels in Human Hepatocytes." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 35 (9): 1687–93. doi:10.1124/dmd.107.015511.
- Aleksa, Katarina, Doug Matsell, Kris Krausz, Harry Gelboin, Shinya Ito, and Gideon Koren. 2005. "Cytochrome P450 3A and 2B6 in the Developing Kidney: Implications for Ifosfamide Nephrotoxicity." *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)* 20 (7): 872–85. doi:10.1007/s00467-004-1807-3.
- Alvarez-Sánchez, B, F Priego-Capote, and M D Luque de Castro. 2009. "Ultrasound-Enhanced Enzymatic Hydrolysis of Conjugated Female Steroids as Pretreatment for Their Analysis by LC-MS/MS in Urine." *The Analyst* 134 (7): 1416–22. doi:10.1039/b816283b.

- Ambrosone, C B, J L Freudenheim, S Graham, J R Marshall, J E Vena, J R Brasure, R Laughlin, T Nemoto, A M Michalek, and A Harrington. 1995. "Cytochrome P4501A1 and Glutathione S-Transferase (M1) Genetic Polymorphisms and Postmenopausal Breast Cancer Risk." *Cancer Research* 55 (16): 3483–85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7627950>.
- Anandatheerthavarada, H K, G Biswas, J Mullick, N B Sepuri, L Otvos, D Pain, and N G Avadhani. 1999. "Dual Targeting of Cytochrome P4502B1 to Endoplasmic Reticulum and Mitochondria Involves a Novel Signal Activation by Cyclic AMP-Dependent Phosphorylation at ser128." *The EMBO Journal* 18 (20). ENGLAND: 5494–5504. doi:10.1093/emboj/18.20.5494.
- Anandatheerthavarada, Hindupur K, Naresh Babu V Sepuri, and Narayan G Avadhani. 2009. "Mitochondrial Targeting of Cytochrome P450 Proteins Containing NH₂-Terminal Chimeric Signals Involves an Unusual TOM20/TOM22 Bypass Mechanism." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (25). United States: 17352–63. doi:10.1074/jbc.M109.007492.
- Anderson, D, T W Yu, and F Hinçal. 1999. "Effect of Some Phthalate Esters in Human Cells in the Comet Assay." *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 19 (4): 275–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10406891>.
- Androutsopoulos, Vasilis P, Aristidis M Tsatsakis, and Demetrios a Spandidos. 2009. "Cytochrome P450 CYP1A1: Wider Roles in Cancer Progression and Prevention." *BMC Cancer* 9: 187. doi:10.1186/1471-2407-9-187.
- Aninat, Caroline, Denise Glaise, Typhen Le Charpentier, Sophie Langou, Fabrice Morel, and Christiane Guguen-guillouzo. 2006. "EXPRESSION OF CYTOCHROMES P450 , CONJUGATING ENZYMES AND NUCLEAR RECEPTORS IN HUMAN HEPATOMA HepaRG CELLS ´ Guillouzo ABSTRACT : " 34 (1): 75–83. doi:10.1124/dmd.105.006759.other.
- Aninat, Caroline, Denise Glaise, Julie Dumont, Fabrice Morel, Jean-michel Poul, and Christiane Guguen-guillouzo. 2008. "Long-Term Functional Stability of Human HepaRG Hepatocytes and Use for Chronic Toxicity and Genotoxicity Studies ABSTRACT : " 36 (6): 1111–18. doi:10.1124/dmd.107.019901.especially.
- Anundi, I, T Lähteenmäki, M Rundgren, P Moldeus, and K O Lindros. 1993. "Zonation of Acetaminophen Metabolism and Cytochrome P450 2E1-Mediated Toxicity Studied in Isolated Periportal and Perivenous Hepatocytes." *Biochemical Pharmacology* 45 (6): 1251–59. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8466546>.
- Araya, Zufan, Fardin Hosseinpour, Karl Bodin, and Kjell Wikvall. 2003. "Metabolism of 25-Hydroxyvitamin D₃ by Microsomal and Mitochondrial Vitamin D₃ 25-Hydroxylases (CYP2D25 and CYP27A1): A Novel Reaction by CYP27A1." *Biochimica et Biophysica Acta* 1632 (1-3). Netherlands: 40–47.

- Argikar, Upendra a. 2012. "Unusual Glucuronides." *Drug Metabolism and Disposition* 40 (7): 1239–51. doi:10.1124/dmd.112.045096.
- Arnich, Nathalie, Paulina Cervantés, Sophie Gallotti, Marie-Hélène Loulergue, and Cécilia Solal. 2005. "Evaluation Des Risques Pour La Santé Humaine Liés À Une Exposition Au Fipronil." *Afsset Afssa*, 173.
- Arnold, Cosima, Anne Konkel, Robert Fischer, and Wolf-Hagen Schunck. "Cytochrome P450-Dependent Metabolism of Omega-6 and Omega-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids." *Pharmacological Reports : PR* 62 (3): 536–47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20631419>.
- Ashby, J. 1985. "Fundamental Structural Alerts to Potential Carcinogenicity or Noncarcinogenicity." *Environmental Mutagenesis* 7 (6): 919–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4065064>.
- Astill, B, E Barber, A Lington, E Moran, A Mulholland, E Robinson, and B Scheider. 1986. "Chemical Industry Voluntary Test Program for Phthalate Esters: Health Effects Studies." *Environmental Health Perspectives* 65 (March): 329–36. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1474691&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Audebert, M, F Zeman, R Beaudoin, a Péry, and J-P Cravedi. 2012. "Comparative Potency Approach Based on H2AX Assay for Estimating the Genotoxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons." *Toxicology and Applied Pharmacology* 260 (1). Elsevier Inc.: 58–64. doi:10.1016/j.taap.2012.01.022.
- Audebert, Marc, L Dolo E Perdu, and Genotoxicity Á H A X Á Lst. 2011. "Use of the c H2AX Assay for Assessing the Genotoxicity of Bisphenol A and Bisphenol F in Human Cell Lines," 1463–73. doi:10.1007/s00204-011-0721-2.
- Aueviriyavit, Sasitorn, Tomomi Furihata, Kaori Morimoto, Kaoru Kobayashi, and Kan Chiba. 2007. "Hepatocyte Nuclear Factor 1 Alpha and 4 Alpha Are Factors Involved in Interindividual Variability in the Expression of UGT1A6 and UGT1A9 but Not UGT1A1, UGT1A3 and UGT1A4 mRNA in Human Livers." *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 22 (5): 391–98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17965524>.
- Bajpayee, Mahima, Alok Kumar Pandey, Sabina Zaidi, Javed Musarrat, Devendra Parmar, Neeraj Mathur, Prahlad Kishore Seth, and Alok Dhawan. 2006. "DNA Damage and Mutagenicity Induced by Endosulfan and Its Metabolites." *Environmental and Molecular Mutagenesis* 47 (9): 682–92. doi:10.1002/em.20255.
- Balaban, Robert S., Shino Nemoto, and Toren Finkel. 2005. "Mitochondria, Oxidants, and Aging." *Cell*. doi:10.1016/j.cell.2005.02.001.
- Bansal, Seema, Chuan-Peng Liu, Naresh B V Sepuri, Hindupur K Anandatheerthavarada, Venkatesh Selvaraj, Jan Hoek, Ginger L Milne, F Peter Guengerich, and Narayan G

- Avadhani. 2010. "Mitochondria-Targeted Cytochrome P450 2E1 Induces Oxidative Damage and Augments Alcohol-Mediated Oxidative Stress." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (32): 24609–19. doi:10.1074/jbc.M110.121822.
- Barbier, Olivier, Daniel Duran-Sandoval, Inés Pineda-Torra, Vladimir Kosykh, Jean-Charles Fruchart, and Bart Staels. 2003. "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Induces Hepatic Expression of the Human Bile Acid Glucuronidating UDP-Glucuronosyltransferase 2B4 Enzyme." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (35): 32852–60. doi:10.1074/jbc.M305361200.
- Barbier, Olivier, Ines Pineda Torra, Audrey Sirvent, Thierry Claudel, Christophe Blanquart, Daniel Duran-Sandoval, Folkert Kuipers, Vladimir Kosykh, Jean-Charles Fruchart, and Bart Staels. 2003. "FXR Induces the UGT2B4 Enzyme in Hepatocytes: A Potential Mechanism of Negative Feedback Control of FXR Activity." *Gastroenterology* 124 (7): 1926–40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12806625>.
- Bar-Nun, S, G Kreibich, M Adesnik, L Alterman, M Negishi, and D D Sabatini. 1980. "Synthesis and Insertion of Cytochrome P-450 into Endoplasmic Reticulum Membranes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77 (2). UNITED STATES: 965–69.
- Baron, J M, D Holler, R Schiffer, S Frankenberg, M Neis, H F Merk, and F K Jugert. 2001. "Expression of Multiple Cytochrome p450 Enzymes and Multidrug Resistance-Associated Transport Proteins in Human Skin Keratinocytes." *The Journal of Investigative Dermatology* 116 (4). United States: 541–48. doi:10.1046/j.1523-1747.2001.01298.x.
- Bauer, Björn, Xiaodong Yang, Anika M S Hartz, Emily R Olson, Rong Zhao, J Cory Kalvass, Gary M Pollack, and David S Miller. 2006. "In Vivo Activation of Human Pregnane X Receptor Tightens the Blood-Brain Barrier to Methadone through P-Glycoprotein up-Regulation." *Molecular Pharmacology* 70: 1212–19. doi:10.1124/mol.106.023796.
- Baylin, Stephen B., and Peter A. Jones. 2011. "A Decade of Exploring the Cancer Epigenome — Biological and Translational Implications." *Nature Reviews Cancer*. doi:10.1038/nrc3130.
- Bedard, Leanne L, and Thomas E Massey. 2006. "Aflatoxin B1-Induced DNA Damage and Its Repair." *Cancer Letters* 241 (2): 174–83. doi:10.1016/j.canlet.2005.11.018.
- Beierle, I, B Meibohm, and H Derendorf. 1999. "Gender Differences in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics." *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 37 (11). GERMANY: 529–47.
- Benigni, Romualdo, and Cecilia Bossa. 2008. "Predictivity and Reliability of QSAR Models: The Case of Mutagens and Carcinogens." *Toxicology Mechanisms and Methods* 18 (2-3): 137–47. doi:10.1080/15376510701857056.

- Bennett, R A, J M Essigmann, and G N Wogan. 1981. "Excretion of an Aflatoxin-Guanine Adduct in the Urine of Aflatoxin B1-Treated Rats." *Cancer Research* 41 (2): 650–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6778611>.
- Bentivegna, C S, M A Ihnat, N S Baptiste, and J W Hamilton. 1998. "Developmental Regulation of the 3-Methylcholanthrene- and Dioxin-Inducible CYP1A5 Gene in Chick Embryo Liver in Vivo." *Toxicology and Applied Pharmacology* 151: 166–73.
- Berg, Jeannette Zinggeler, Linda B von Weymarn, Elizabeth A Thompson, Katherine M Wickham, Natalie A Weisensel, Dorothy K Hatsukami, and Sharon E Murphy. 2010. "UGT2B10 Genotype Influences Nicotine Glucuronidation, Oxidation, and Consumption." *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 19 (6): 1423–31. doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-0959.
- Bigo, Cyril, Sarah Caron, Amélie Dallaire-Thérroux, and Olivier Barbier. 2013. "Nuclear Receptors and Endobiotics Glucuronidation: The Good, the Bad, and the UGT." *Drug Metabolism Reviews* 45 (October 2012): 34–47. doi:10.3109/03602532.2012.751992.
- Billinton, Nicholas, Paul W Hastwell, Dominiek Beerens, Louise Birrell, Patricia Ellis, Sharon Maskell, Thomas W Webster, et al. 2008. "Interlaboratory Assessment of the GreenScreen HC GADD45a-GFP Genotoxicity Screening Assay: An Enabling Study for Independent Validation as an Alternative Method." *Mutation Research* 653 (1-2): 23–33. doi:10.1016/j.mrgentox.2008.02.011.
- Birrell, Louise, Paul Cahill, Chris Hughes, Matthew Tate, and Richard M Walmsley. 2010. "GADD45a-GFP GreenScreen HC Assay Results for the ECVAM Recommended Lists of Genotoxic and Non-Genotoxic Chemicals for Assessment of New Genotoxicity Tests." *Mutation Research* 695 (1-2). Elsevier B.V.: 87–95. doi:10.1016/j.mrgentox.2009.12.008.
- Bissell, D M, D M Arenson, J J Maher, and F J Roll. 1987. "Support of Cultured Hepatocytes by a Laminin-Rich Gel. Evidence for a Functionally Significant Subendothelial Matrix in Normal Rat Liver." *The Journal of Clinical Investigation* 79 (3): 801–12. doi:10.1172/JCI112887.
- Bláha, Ludek, Petra Kapplová, Jan Vondráček, Brad Upham, and Miroslav Machala. 2002. "Inhibition of Gap-Junctional Intercellular Communication by Environmentally Occurring Polycyclic Aromatic Hydrocarbons." *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology* 65 (1): 43–51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11752684>.
- Bock, Karl Walter. 2010. "Functions and Transcriptional Regulation of Adult Human Hepatic UDP-Glucuronosyl-Transferases (UGTs): Mechanisms Responsible for Interindividual Variation of UGT Levels." *Biochemical Pharmacology* 80: 771–77. doi:10.1016/j.bcp.2010.04.034.

- Bock, Karl Walter, and Christoph Köhle. 2005. "UDP-Glucuronosyltransferase 1A6: Structural, Functional, and Regulatory Aspects." *Methods in Enzymology* 400 (January): 57–75. doi:10.1016/S0076-6879(05)00004-2.
- Boopathi, Ettickan, Satish Srinivasan, Ji-Kang Fang, and Narayan G Avadhani. 2008. "Bimodal Protein Targeting through Activation of Cryptic Mitochondrial Targeting Signals by an Inducible Cytosolic Endoprotease." *Molecular Cell* 32 (1): 32–42. doi:10.1016/j.molcel.2008.09.008.
- Braeuning, Albert, Carina Ittrich, Christoph Köhle, Stephan Hailfinger, Michael Bonin, Albrecht Buchmann, and Michael Schwarz. 2006. "Differential Gene Expression in Periportal and Perivenous Mouse Hepatocytes." *FEBS Journal* 273: 5051–61. doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05503.x.
- BRODIE, B B, and J AXELROD. 1948. "The Estimation of Acetanilide and Its Metabolic Products, Aniline, N-Acetyl P-Aminophenol and P-Amino-Phenol, Free and Total Conjugated, in Biological Fluids and Tissues." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 94 (1): 22–28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18885610>.
- Brown, Guy C, and Vilmante Borutaite. 2012. "There Is No Evidence That Mitochondria Are the Main Source of Reactive Oxygen Species in Mammalian Cells." *Mitochondrion* 12 (1). Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society: 1–4. doi:10.1016/j.mito.2011.02.001.
- Burk, Oliver, Katja A Arnold, Anke Geick, Heike Tegude, and Michel Eichelbaum. 2005. "A Role for Constitutive Androstane Receptor in the Regulation of Human Intestinal MDR1 Expression." *Biological Chemistry* 386 (6). Germany: 503–13. doi:10.1515/BC.2005.060.
- Busby, W F, M E Goldman, P M Newberne, and G N Wogan. 1984. "Tumorigenicity of Fluoranthene in a Newborn Mouse Lung Adenoma Bioassay." *Carcinogenesis* 5 (10): 1311–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6488452>.
- Butura, Angelica, Kerstin Nilsson, Kengathevy Morgan, Timothy R Morgan, Samuel W French, Inger Johansson, Ina Schuppe-Koistinen, and Magnus Ingelman-Sundberg. 2009. "The Impact of CYP2E1 on the Development of Alcoholic Liver Disease as Studied in a Transgenic Mouse Model." *Journal of Hepatology* 50 (3): 572–83. doi:10.1016/j.jhep.2008.10.020.
- Cahill, Alan, Carol C Cunningham, Masayuki Adachi, Hiromasa Ishii, Shannon M Bailey, Bernard Fromenty, and Adrian Davies. 2002. "Effects of Alcohol and Oxidative Stress on Liver Pathology: The Role of the Mitochondrion." *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 26 (6): 907–15. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2670542&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Carlini, Leslie E, Neal J Meropol, John Bever, Michael L Andria, Todd Hill, Philip Gold, Andre Rogatko, Hao Wang, and Rebecca L Blanchard. 2005. "UGT1A7 and UGT1A9 Polymorphisms Predict Response and Toxicity in Colorectal Cancer Patients Treated with Capecitabine/irinotecan." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 11 (3): 1226–36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15709193>.
- Carlson, David B, and Gary H Perdew. 2002. "A Dynamic Role for the Ah Receptor in Cell Signaling? Insights from a Diverse Group of Ah Receptor Interacting Proteins." *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 16 (6): 317–25. doi:10.1002/jbt.10051.
- Carriere, V, T Goasduff, D Ratanasavanh, F Morel, J C Gautier, A Guillouzo, P Beaune, and F Berthou. "Both Cytochromes P450 2E1 and 1A1 Are Involved in the Metabolism of Chlorzoxazone." *Chemical Research in Toxicology* 6 (6): 852–57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7509644>.
- Casabar, Richard C T, Parikshit C Das, Gregory K Dekrey, Catherine S Gardiner, Yan Cao, Randy L Rose, and Andrew D Wallace. 2010. "Endosulfan Induces CYP2B6 and CYP3A4 by Activating the Pregnane X Receptor." *Toxicology and Applied Pharmacology* 245 (3). Elsevier Inc.: 335–43. doi:10.1016/j.taap.2010.03.017.
- Casabar, Richard C T, Andrew D Wallace, Ernest Hodgson, and Randy L Rose. 2006. "Metabolism of Endosulfan-Alpha by Human Liver Microsomes and Its Utility as a Simultaneous in Vitro Probe for CYP2B6 and CYP3A4." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 34 (10): 1779–85. doi:10.1124/dmd.106.010199.
- Cavaliere, E, K Frenkel, J G Liehr, E Rogan, and D Roy. 2000. "Estrogens as Endogenous Genotoxic Agents--DNA Adducts and Mutations." *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, no. 27 (January): 75–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10963621>.
- Cederbaum, Arthur I. 2006. "Cytochrome P450 2E1-Dependent Oxidant Stress and Upregulation of Anti-Oxidant Defense in Liver Cells." *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 21 Suppl 3 (October): S22–25. doi:10.1111/j.1440-1746.2006.04595.x.
- Çelik, Ayla, Seda Yaprak Ekinci, Gizem Güler, and Seda Yildirim. 2014. "In Vitro Genotoxicity of Fipronil Sister Chromatid Exchange, Cytokinesis Block Micronucleus Test, and Comet Assay." *DNA and Cell Biology* 33 (3): 148–54. doi:10.1089/dna.2013.2158.
- Cerec, Virginie, Denise Glaise, Delphine Garnier, Serban Morosan, Bruno Turlin, Bernard Drenou, Philippe Gripon, Dina Kremsdorf, Christiane Guguen-Guillouzo, and Anne Corlu. 2007. "Transdifferentiation of Hepatocyte-like Cells from the Human Hepatoma HepaRG Cell Line through Bipotent Progenitor." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 45 (4): 957–67. doi:10.1002/hep.21536.

- Chakravarthy, Manu V, Irfan J Lodhi, Li Yin, Raghu R V Malapaka, H Eric Xu, John Turk, and Clay F Semenkovich. 2009. "Identification of a Physiologically Relevant Endogenous Ligand for PPARalpha in Liver." *Cell* 138 (3): 476–88. doi:10.1016/j.cell.2009.05.036.
- Chang, C, D R Smith, V S Prasad, C L Sidman, D W Nebert, and A Puga. 1993. "Ten Nucleotide Differences, Five of Which Cause Amino Acid Changes, Are Associated with the Ah Receptor Locus Polymorphism of C57BL/6 and DBA/2 Mice." *Pharmacogenetics* 3 (6): 312–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8148872>.
- Chauret, N, A Gauthier, and D A Nicoll-Griffith. 1998. "Effect of Common Organic Solvents on in Vitro Cytochrome P450-Mediated Metabolic Activities in Human Liver Microsomes." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 26 (1): 1–4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9443844>.
- Chen, Q, and a I Cederbaum. 1998. "Cytotoxicity and Apoptosis Produced by Cytochrome P450 2E1 in Hep G2 Cells." *Molecular Pharmacology* 53 (4): 638–48. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9547353>.
- Chen, Yakun, Yong Tang, Man Tzu Wang, Su Zeng, and Daotai Nie. 2007. "Human Pregnane X Receptor and Resistance to Chemotherapy in Prostate Cancer." *Cancer Research* 67: 10361–67. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4758.
- Choi, Jae Seok, Young Jun Lee, Tae Hyung Kim, Hyun Jung Lim, Mee Young Ahn, Seung Jun Kwack, Tae Seok Kang, et al. 2011. "Molecular Mechanism of Tetrabromobisphenol A (TBBPA)-Induced Target Organ Toxicity in Sprague-Dawley Male Rats." *Toxicological Research* 27 (2): 61–70. doi:10.5487/TR.2011.27.2.061.
- Chouinard, Sarah, Mélanie Tessier, Gabrielle Vernouillet, Sylvain Gauthier, Fernand Labrie, Olivier Barbier, and Alain Bélanger. 2006. "Inactivation of the Pure Antiestrogen Fulvestrant and Other Synthetic Estrogen Molecules by UDP-Glucuronosyltransferase 1A Enzymes Expressed in Breast Tissue." *Molecular Pharmacology* 69 (3): 908–20. doi:10.1124/mol.105.015891.
- Chramostová, Katerina, Jan Vondráček, Lenka Sindlerová, Borivoj Vojtesek, Alois Kozubík, and Miroslav Machala. 2004. "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Modulate Cell Proliferation in Rat Hepatic Epithelial Stem-like WB-F344 Cells." *Toxicology and Applied Pharmacology* 196 (1): 136–48. doi:10.1016/j.taap.2003.12.008.
- Correia, Maria Almira. 2003. "Hepatic Cytochrome P450 Degradation: Mechanistic Diversity of the Cellular Sanitation Brigade." *Drug Metabolism Reviews* 35 (2-3). United States: 107–43. doi:10.1081/DMR-120023683.
- Cotreau, Monette M, Lisa L von Moltke, and David J Greenblatt. 2005. "The Influence of Age and Sex on the Clearance of Cytochrome P450 3A Substrates." *Clinical Pharmacokinetics* 44 (1). New Zealand: 33–60. doi:10.2165/00003088-200544010-00002.

- Cottrell, G Trevor, and Janis M Burt. 2005. "Functional Consequences of Heterogeneous Gap Junction Channel Formation and Its Influence in Health and Disease." *Biochimica et Biophysica Acta* 1711 (2): 126–41. doi:10.1016/j.bbamem.2004.11.013.
- Coumoul, Xavier, Monique Diry, and Robert Barouki. 2002. "PXR-Dependent Induction of Human CYP3A4 Gene Expression by Organochlorine Pesticides." *Biochemical Pharmacology* 64 (10): 1513–19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12417264>.
- Crabb, D W, H J Edenberg, W F Bosron, and T K Li. 1989. "Genotypes for Aldehyde Dehydrogenase Deficiency and Alcohol Sensitivity. The Inactive ALDH2(2) Allele Is Dominant." *The Journal of Clinical Investigation* 83 (1): 314–16. doi:10.1172/JCI113875.
- Crane, Alice L., Kathrin Klein, and James R. Olson. 2012. "Bioactivation of Chlorpyrifos by CYP2B6 Variants." *Xenobiotica* 42 (June): 1–8. doi:10.3109/00498254.2012.702246.
- Cravedi, J. P., G. Delous, D. Zalko, C. Viguié, and L. Debrauwer. 2013. "Disposition of Fipronil in Rats." *Chemosphere* 93 (10). Elsevier Ltd: 2276–83. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.07.083.
- Crespi, C L, F J Gonzalez, D T Steimel, T R Turner, H V Gelboin, B W Penman, and R Langenbach. "A Metabolically Competent Human Cell Line Expressing Five cDNAs Encoding Procarcinogen-Activating Enzymes: Application to Mutagenicity Testing." *Chemical Research in Toxicology* 4 (5): 566–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1793807>.
- Curren, Rodger D, Greg C Mun, David P Gibson, and Marilyn J Aardema. 2006. "Development of a Method for Assessing Micronucleus Induction in a 3D Human Skin Model (EpiDerm)." *Mutation Research* 607: 192–204. doi:10.1016/j.mrgentox.2006.04.016.
- Currie, Richard A. 2012. "Toxicogenomics: The Challenges and Opportunities to Identify Biomarkers, Signatures and Thresholds to Support Mode-of-Action." *Mutation Research* 746 (2): 97–103. doi:10.1016/j.mrgentox.2012.03.002.
- Das, Parikshit C., Yan Cao, Nathan Cherrington, Ernest Hodgson, and Randy L. Rose. 2006. "Fipronil Induces CYP Isoforms and Cytotoxicity in Human Hepatocytes." *Chemico-Biological Interactions* 164 (3): 200–214.
- De Waziers, I, P H Cugnenc, C S Yang, J P Leroux, and P H Beaune. 1990. "Cytochrome P 450 Isoenzymes, Epoxide Hydrolase and Glutathione Transferases in Rat and Human Hepatic and Extrahepatic Tissues." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 253 (1). UNITED STATES: 387–94.
- Del Castillo-Olivares, Antonio, Jose A Campos, William M Pandak, and Gregorio Gil. 2004. "The Role of alpha1-Fetoprotein Transcription factor/LRH-1 in Bile Acid Biosynthesis: A Known Nuclear Receptor Activator That Can Act as a Suppressor of Bile Acid Biosynthesis." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (16). United States: 16813–21. doi:10.1074/jbc.M400646200.

- Demeilliers, Christine, Caroline Maisonneuve, Alain Grodet, Abdellah Mansouri, Richard Nguyen, Marina Tinel, Philippe Lettéron, et al. 2002. "Impaired Adaptive Resynthesis and Prolonged Depletion of Hepatic Mitochondrial DNA after Repeated Alcohol Binges in Mice." *Gastroenterology* 123 (4): 1278–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12360488>.
- Dennis, M J, R C Massey, D J McWeeny, M E Knowles, and D Watson. 1983. "Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in UK Total Diets." *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 21 (5): 569–74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6686183>.
- Desmots, Fabienne, Mary Rissel, David Gilot, Dominique Lagadic-Gossmann, Fabrice Morel, Christiane Guguen-Guillouzo, André Guillouzo, and Pascal Loyer. 2002. "Pro-Inflammatory Cytokines Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin-6 and Survival Factor Epidermal Growth Factor Positively Regulate the Murine GSTA4 Enzyme in Hepatocytes." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (20): 17892–900. doi:10.1074/jbc.M112351200.
- Desmots, Fabienne, Mary Rissel, Christelle Pigeon, Pascal Loyer, Olivier Loréal, and André Guillouzo. 2002. "Differential Effects of Iron Overload on GST Isoform Expression in Mouse Liver and Kidney and Correlation between GSTA4 Induction and Overproduction of Free Radicles." *Free Radical Biology & Medicine* 32 (1): 93–101. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11755321>.
- Desta, Zeruesenay, Tanja Saussele, Bryan Ward, Julia Blievernicht, Lang Li, Kathrin Klein, David A Flockhart, and Ulrich M Zanger. 2007. "Impact of CYP2B6 Polymorphism on Hepatic Efavirenz Metabolism in Vitro." *Pharmacogenomics* 8 (6): 547–58. doi:10.2217/14622416.8.6.547.
- Dicker, E, T McHugh, and A I Cederbaum. 1990. "Increased Oxidation of P-Nitrophenol and Aniline by Intact Hepatocytes Isolated from Pyrazole-Treated Rats." *Biochimica et Biophysica Acta* 1035 (3): 249–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2207123>.
- Diesen, Diana L, and Paul C Kuo. 2010. "Nitric Oxide and Redox Regulation in the Liver: Part I. General Considerations and Redox Biology in Hepatitis." *The Journal of Surgical Research* 162 (1): 95–109. doi:10.1016/j.jss.2009.09.019.
- Ding, Xinxin, and Laurence S Kaminsky. 2003. "Human Extrahepatic Cytochromes P450: Function in Xenobiotic Metabolism and Tissue-Selective Chemical Toxicity in the Respiratory and Gastrointestinal Tracts." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 43 (January): 149–73. doi:10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140251.
- Ding, Xunshan, and Jeff L Staudinger. 2005. "Induction of Drug Metabolism by Forskolin: The Role of the Pregnane X Receptor and the Protein Kinase a Signal Transduction Pathway." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 312 (2). United States: 849–56. doi:10.1124/jpet.104.076331.

- Dinkova-Kostova, Albena T, W David Holtzclaw, Robert N Cole, Ken Itoh, Nobunao Wakabayashi, Yasutake Katoh, Masayuki Yamamoto, and Paul Talalay. 2002. "Direct Evidence That Sulfhydryl Groups of Keap1 Are the Sensors Regulating Induction of Phase 2 Enzymes That Protect against Carcinogens and Oxidants." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (18): 11908–13. doi:10.1073/pnas.172398899.
- Dobrovolsky, Vasily N., Daishiro Miura, Robert H. Heflich, and Stephen D. Dertinger. 2010. "The in Vivo Pig-a Gene Mutation Assay, a Potential Tool for Regulatory Safety Assessment." *Environmental and Molecular Mutagenesis*. doi:10.1002/em.20627.
- Doktorova, Tatyana Y, Reha Yildirimman, Mathieu Vinken, Mireia Vilardell, Tamara Vanhaecke, Hans Gmuender, Roque Bort, et al. 2013. "Transcriptomic Responses Generated by Hepatocarcinogens in a Battery of Liver-Based in Vitro Models." *Carcinogenesis* 34 (6): 1393–1402. doi:10.1093/carcin/bgt054.
- Dong, Z G, J Y Hong, Q A Ma, D C Li, J Bullock, F J Gonzalez, S S Park, H V Gelboin, and C S Yang. 1988. "Mechanism of Induction of Cytochrome P-450ac (P-450j) in Chemically Induced and Spontaneously Diabetic Rats." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 263 (1): 29–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3285794>.
- Dreisbach, A W, N Ferencz, N E Hopkins, M G Fuentes, A B Rege, W J George, and J J Lertora. 1995. "Urinary Excretion of 6-Hydroxychlorzoxazone as an Index of CYP2E1 Activity." *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 58 (5): 498–505. doi:10.1016/0009-9236(95)90169-8.
- Durant, J L, W F Busby, A L Lafleur, B W Penman, and C L Crespi. 1996. "Human Cell Mutagenicity of Oxygenated, Nitrated and Unsubstituted Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Associated with Urban Aerosols." *Mutation Research* 371 (3-4): 123–57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9008716>.
- Easterbrook, J, C Lu, Y Sakai, and A P Li. 2001. "Effects of Organic Solvents on the Activities of Cytochrome P450 Isoforms, UDP-Dependent Glucuronyl Transferase, and Phenol Sulfotransferase in Human Hepatocytes." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 29 (2): 141–44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11159803>.
- Eaton, D L, and E P Gallagher. 1994. "Mechanisms of Aflatoxin Carcinogenesis." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 34 (January): 135–72. doi:10.1146/annurev.pa.34.040194.001031.
- Edavana, Vineetha K, Rosalind B Penney, Aiwei Yao-Borengasser, Suzanne Williams, Lora Rogers, Ishwori B Dhakal, and Susan Kadlubar. 2013. "Fulvestrant up Regulates UGT1A4 and MRPs through ER α and c-Myb Pathways: A Possible Primary Drug Disposition Mechanism." *SpringerPlus* 2 (January): 620. doi:10.1186/2193-1801-2-620.

- Edwards, Jeffrey E, Randy L Rose, and Ernest Hodgson. 2005. "The Metabolism of Nonane, a JP-8 Jet Fuel Component, by Human Liver Microsomes, P450 Isoforms and Alcohol Dehydrogenase and Inhibition of Human P450 Isoforms by JP-8." *Chemico-Biological Interactions* 151 (3): 203–11. doi:10.1016/j.cbi.2004.12.003.
- Ekins, S, M Vandenbranden, B J Ring, J S Gillespie, T J Yang, H V Gelboin, and S A Wrighton. 1998. "Further Characterization of the Expression in Liver and Catalytic Activity of CYP2B6." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 286 (3): 1253–59. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9732386>.
- El-Bachá, R S, S Leclerc, P Netter, J Magdalou, and A Minn. 2000. "Glucuronidation of Apomorphine." *Life Sciences* 67 (14): 1735–45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11021358>.
- Elliott, B M, and C R Elcombe. 1987. "Lack of DNA Damage or Lipid Peroxidation Measured in Vivo in the Rat Liver Following Treatment with Peroxisomal Proliferators." *Carcinogenesis* 8 (9): 1213–18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3621460>.
- Elsby, Robert, Neil R Kitteringham, Christopher E Goldring, Cerys A Lovatt, Mark Chamberlain, Colin J Henderson, C Roland Wolf, and B Kevin Park. 2003. "Increased Constitutive c-Jun N-Terminal Kinase Signaling in Mice Lacking Glutathione S-Transferase Pi." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (25): 22243–49. doi:10.1074/jbc.M301211200.
- El-Serag, Hashem B, and K Lenhard Rudolph. 2007. "Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis." *Gastroenterology* 132 (7): 2557–76. doi:10.1053/j.gastro.2007.04.061.
- Elsohly, Mahmoud A, Waseem Gul, Shixia Feng, and Timothy P Murphy. 2005. "Hydrolysis of Conjugated Metabolites of Buprenorphine II. The Quantitative Enzymatic Hydrolysis of Norbuprenorphine-3-Beta-D-Glucuronide in Human Urine." *Journal of Analytical Toxicology* 29 (6): 570–73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16168181>.
- Erichsen, Thomas J, André Aehlen, Ursula Ehmer, Sandra Kalthoff, Michael P Manns, and Christian P Strassburg. 2010. "Regulation of the Human Bile Acid UDP-Glucuronosyltransferase 1A3 by the Farnesoid X Receptor and Bile Acids." *Journal of Hepatology* 52 (4): 570–78. doi:10.1016/j.jhep.2010.01.010.
- Erkekoglu, Pinar, and Belma Kocer-gumusel. 2014. "Genotoxicity of Phthalates" 6516: 1–11. doi:10.3109/15376516.2014.960987.
- Erkekoğlu, Pinar, Walid Rachidi, Viviana De Rosa, Belma Giray, Alain Favier, and Filiz Hincal. 2010. "Protective Effect of Selenium Supplementation on the Genotoxicity of di(2-Ethylhexyl)phthalate and mono(2-Ethylhexyl)phthalate Treatment in LNCaP Cells." *Free Radical Biology & Medicine* 49 (4): 559–66. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.038.

- Ernstgård, Lena, Margareta Warholm, and Gunnar Johanson. 2004. "Robustness of Chlorzoxazone as an in Vivo Measure of Cytochrome P450 2E1 Activity." *British Journal of Clinical Pharmacology* 58 (2): 190–200. doi:10.1111/j.1365-2125.2004.02132.x.
- Fahmi, Odette A, Judy L Raucy, Elsa Ponce, Saleema Hassanali, and Jerome M Lasker. 2012. "Utility of DPX2 Cells for Predicting CYP3A Induction-Mediated Drug-Drug Interactions and Associated Structure-Activity Relationships □ ABSTRACT :," 2204–11.
- Falkner, K C, J A Pinaire, G H Xiao, T E Geoghegan, and R A Prough. 2001. "Regulation of the Rat Glutathione S-Transferase A2 Gene by Glucocorticoids: Involvement of Both the Glucocorticoid and Pregnane X Receptors." *Molecular Pharmacology* 60 (3). United States: 611–19.
- Faucette, Stephanie R, Hongbing Wang, Geraldine A Hamilton, Summer L Jolley, Darryl Gilbert, Celeste Lindley, Bingfang Yan, Masahiko Negishi, and Edward L Lecluyse. 2004. "REGULATION OF CYP2B6 IN PRIMARY HUMAN HEPATOCYTES BY Prototypical Inducers" 32 (3): 1–11. papers3://publication/uuid/462F4737-EEA0-4B63-89AE-D43654585F96.
- Fellows, Michael D, Michael R O'Donovan, Elisabeth Lorge, and David Kirkland. 2008. "Comparison of Different Methods for an Accurate Assessment of Cytotoxicity in the in Vitro Micronucleus Test. II: Practical Aspects with Toxic Agents." *Mutation Research* 655 (1-2): 4–21. doi:10.1016/j.mrgentox.2008.06.004.
- Ferguson, Stephen S, Edward L LeCluyse, Masahiko Negishi, and Joyce A Goldstein. 2002. "Regulation of Human CYP2C9 by the Constitutive Androstane Receptor: Discovery of a New Distal Binding Site." *Molecular Pharmacology* 62 (3). United States: 737–46.
- Finot, Francis, Régis Masson, Fabienne Desmots, Catherine Ribault, Nicole Bichet, Joan A Vericat, Patricia Lafouge, Christiane Guguen-Guillouzo, and Pascal Loyer. 2012. "Combined Stimulation with the Tumor Necrosis Factor A and the Epidermal Growth Factor Promotes the Proliferation of Hepatocytes in Rat Liver Cultured Slices." *International Journal of Hepatology* 2012 (January): 785786. doi:10.1155/2012/785786.
- Forsyth, Christopher B, Robin M Voigt, and Ali Keshavarzian. 2014. "Intestinal CYP2E1: A Mediator of Alcohol-Induced Gut Leakiness." *Redox Biology* 3C (January): 40–46. doi:10.1016/j.redox.2014.10.002.
- Fowler, Paul, Robert Smith, Katie Smith, Jamie Young, Laura Jeffrey, David Kirkland, Stefan Pfuhler, and Paul Carmichael. 2012. "Reduction of Misleading ('false') Positive Results in Mammalian Cell Genotoxicity Assays. II. Importance of Accurate Toxicity Measurement." *Mutation Research* 747 (1). Elsevier B.V.: 104–17. doi:10.1016/j.mrgentox.2012.04.013.
- Fromenty, Bernard. 2013. "Drug-Induced Liver Injury in Obesity." *Journal of Hepatology* 58 (4): 824–26. doi:10.1016/j.jhep.2012.12.018.

- Fukumura, Dai, Satoshi Kashiwagi, and Rakesh K Jain. 2006. "The Role of Nitric Oxide in Tumour Progression." *Nature Reviews. Cancer* 6: 521–34. doi:10.1038/nrc1910.
- Furuta, Mayuko, Ken-ich Kozaki, Shinji Tanaka, Shigeki Arii, Issei Imoto, and Johji Inazawa. 2010. "miR-124 and miR-203 Are Epigenetically Silenced Tumor-Suppressive microRNAs in Hepatocellular Carcinoma." *Carcinogenesis* 31 (5): 766–76. doi:10.1093/carcin/bgp250.
- Gerbal-chaloin, Sabine, Anne-sophie Dumé, Philippe Briolotti, Sylvie Klieber, Edith Raulet, Cédric Duret, Jean-michel Fabre, et al. 2014. "The WNT / B -Catenin Pathway Is a Transcriptional Regulator of CYP2E1 , CYP1A2 , and Aryl Hydrocarbon Receptor Gene Expression in Primary Human Hepatocytes," no. December: 624–34.
- Gervot, L, B Rochat, J C Gautier, F Bohnenstengel, H Kroemer, V de Berardinis, H Martin, P Beaune, and I de Waziers. 1999. "Human CYP2B6: Expression, Inducibility and Catalytic Activities." *Pharmacogenetics* 9 (3): 295–306. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10471061>.
- Ghotbi, Roza, Alvin Gomez, Lili Milani, Gunnel Tybring, Ann-Christine Syvanen, Leif Bertilsson, Magnus Ingelman-Sundberg, and Eleni Aklillu. 2009. "Allele-Specific Expression and Gene Methylation in the Control of CYP1A2 mRNA Level in Human Livers." *The Pharmacogenomics Journal* 9 (3). United States: 208–17. doi:10.1038/tpj.2009.4.
- Gilday, Deidre, Maureen Gannon, Katherine Yutzey, David Bader, and Arleen B. Rifkind. 1996. "Molecular Cloning and Expression of Two Novel Avian Cytochrome P450 1A Enzymes Induced by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin." *Journal of Biological Chemistry* 271: 33054–59. doi:10.1074/jbc.271.51.33054.
- Gilot, David, Pascal Loyer, Anne Corlu, Denise Glaise, Dominique Lagadic-Gossmann, Azeddine Atfi, Fabrice Morel, Hidenori Ichijo, and Christiane Guguen-Guillouzo. 2002. "Liver Protection from Apoptosis Requires Both Blockage of Initiator Caspase Activities and Inhibition of ASK1/JNK Pathway via Glutathione S-Transferase Regulation." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (51): 49220–29. doi:10.1074/jbc.M207325200.
- Glickman, Michael H, and Aaron Ciechanover. 2002. "The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction." *Physiological Reviews* 82 (2). United States: 373–428. doi:10.1152/physrev.00027.2001.
- Goetz, Amber K, Bhanu P Singh, Michael Battalora, Joseph M Breier, Jason P Bailey, Amechi C Chukwudebe, and Erik R Janus. 2011. "Current and Future Use of Genomics Data in Toxicology: Opportunities and Challenges for Regulatory Applications." *Regulatory Toxicology and Pharmacology : RTP* 61 (2): 141–53. doi:10.1016/j.yrtph.2011.07.012.
- Gonzalez, Frank J. 2005. "Role of Cytochromes P450 in Chemical Toxicity and Oxidative Stress: Studies with CYP2E1." *Mutation Research* 569 (1-2): 101–10. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.04.021.

- Goodwin, B, E Hodgson, and C Liddle. 1999. "The Orphan Human Pregnane X Receptor Mediates the Transcriptional Activation of CYP3A4 by Rifampicin through a Distal Enhancer Module." *Molecular Pharmacology* 56 (6): 1329–39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10570062>.
- Gorski, J C, D R Jones, S a Wrighton, and S D Hall. 1997. "Contribution of Human CYP3A Subfamily Members to the 6-Hydroxylation of Chlorzoxazone." *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems* 27: 243–56. doi:10.1080/004982597240578.
- Graham, S E, and J A Peterson. 1999. "How Similar Are P450s and What Can Their Differences Teach Us?" *Archives of Biochemistry and Biophysics* 369 (1). UNITED STATES: 24–29. doi:10.1006/abbi.1999.1350.
- Granger, D. L., J. B. Hibbs, J. R. Perfect, and D. T. Durack. 1988. "Specific Amino Acid (L-Arginine) Requirement for the Microbiostatic Activity of Murine Macrophages." *Journal of Clinical Investigation* 81: 1129–36. doi:10.1172/JCI113427.
- Gregory, Philip A, Dione A Gardner-Stephen, Anne Rogers, Michael Z Michael, and Peter I Mackenzie. 2006. "The Caudal-Related Homeodomain Protein Cdx2 and Hepatocyte Nuclear Factor 1alpha Cooperatively Regulate the UDP-Glucuronosyltransferase 2B7 Gene Promoter." *Pharmacogenetics and Genomics* 16 (7): 527–36. doi:10.1097/01.fpc.0000215068.06471.35.
- Gregory, Philip A, Rikke H Lewinsky, Dione A Gardner-Stephen, and Peter I Mackenzie. 2004. "Coordinate Regulation of the Human UDP-Glucuronosyltransferase 1A8, 1A9, and 1A10 Genes by Hepatocyte Nuclear Factor 1alpha and the Caudal-Related Homeodomain Protein 2." *Molecular Pharmacology* 65 (4): 953–63. doi:10.1124/mol.65.4.953.
- Greywe, Daniela, Jürgen Kreutz, Norbert Banduhn, Matthias Krauledat, Julia Scheel, Klaus R Schroeder, Thorsten Wolf, and Kerstin Reisinger. 2012. "Applicability and Robustness of the Hen's Egg Test for Analysis of Micronucleus Induction (HET-MN): Results from an Inter-Laboratory Trial." *Mutation Research* 747 (1). Elsevier B.V.: 118–34. doi:10.1016/j.mrgentox.2012.04.012.
- Gripon, Philippe, Sylvie Rumin, Stephan Urban, Jacques Le Seyec, Denise Glaise, Isabelle Cannie, Claire Guyomard, Josette Lucas, Christian Trepo, and Christiane Guguen-Guillouzo. 2002a. "Infection of a Human Hepatoma Cell Line by Hepatitis B Virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15655–60. doi:10.1073/pnas.232137699.
- . 2002b. "Infection of a Human Hepatoma Cell Line by Hepatitis B Virus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (24): 15655–60. doi:10.1073/pnas.232137699.
- Groopman, John D, Thomas W Kensler, and Christopher P Wild. 2008. "Protective Interventions to Prevent Aflatoxin-Induced Carcinogenesis in Developing Countries."

- Annual Review of Public Health* 29 (January): 187–203. doi:10.1146/annurev.publhealth.29.020907.090859.
- Guengerich, F Peter. 2006. "Cytochrome P450s and Other Enzymes in Drug Metabolism and Toxicity." *The AAPS Journal* 8 (1). United States: E101–11. doi:10.1208/aapsj080112.
- Guengerich, F. Peter. 2007. "Mechanisms of Cytochrome P450 Substrate Oxidation: MiniReview." *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 21 (4): 163–68. doi:10.1002/jbt.20174.
- Guguen-Guillouzo, C, J P Campion, P Brissot, D Glaise, B Launois, M Bourel, and A Guillouzo. 1982. "High Yield Preparation of Isolated Human Adult Hepatocytes by Enzymatic Perfusion of the Liver." *Cell Biology International Reports* 6 (6): 625–28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6286153>.
- Guguen-Guillouzo, C, B Clément, G Baffet, C Beaumont, E Morel-Chany, D Glaise, and A Guillouzo. 1983. "Maintenance and Reversibility of Active Albumin Secretion by Adult Rat Hepatocytes Co-Cultured with Another Liver Epithelial Cell Type." *Experimental Cell Research* 143 (1): 47–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6825722>.
- Guillouzo, A, F Morel, D Ratanasavanh, C Chesne, and C Guguen-Guillouzo. 1990. "Long-Term Culture of Functional Hepatocytes." *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 4 (4-5): 415–27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20702206>.
- Guillouzo, André, Anne Corlu, Caroline Aninat, Denise Glaise, Fabrice Morel, and Christiane Guguen-Guillouzo. 2007. "The Human Hepatoma HepaRG Cells: A Highly Differentiated Model for Studies of Liver Metabolism and Toxicity of Xenobiotics." *Chemico-Biological Interactions* 168 (1): 66–73. doi:10.1016/j.cbi.2006.12.003.
- Guillouzo, André, and Christiane Guguen-Guillouzo. 2008. "Evolving Concepts in Liver Tissue Modeling and Implications for in Vitro Toxicology." *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 4 (10): 1279–94. doi:10.1517/17425255.4.10.1279.
- Gunes, Arzu, and Marja-Liisa Dahl. 2008. "Variation in CYP1A2 Activity and Its Clinical Implications: Influence of Environmental Factors and Genetic Polymorphisms." *Pharmacogenomics* 9 (5): 625–37. doi:10.2217/14622416.9.5.625.
- Hainaut, P, and G P Pfeifer. 2001. "Patterns of p53 G→T Transversions in Lung Cancers Reflect the Primary Mutagenic Signature of DNA-Damage by Tobacco Smoke." *Carcinogenesis* 22 (3): 367–74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238174>.
- Han, Eun Hee, Jin Hee Park, Keon Wook Kang, Tae Cheon Jeong, Hyung Sik Kim, and Hye Gwang Jeong. 2009. "Risk Assessment of Tetrabromobisphenol A on Cyclooxygenase-2 Expression via MAP kinase/NF-kappaB/AP-1 Signaling Pathways in Murine Macrophages." *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* 72 (21-22): 1431–38. doi:10.1080/15287390903212873.

- Hannemann, Frank, Andreas Bichet, Kerstin M Ewen, and Rita Bernhardt. 2007. "Cytochrome P450 Systems--Biological Variations of Electron Transport Chains." *Biochimica et Biophysica Acta* 1770 (3). Netherlands: 330–44. doi:10.1016/j.bbagen.2006.07.017.
- Haouzi, D, M Lekéhal, a Moreau, C Moulis, G Feldmann, M a Robin, P Lettéron, D Fau, and D Pessayre. 2000. "Cytochrome P450-Generated Reactive Metabolites Cause Mitochondrial Permeability Transition, Caspase Activation, and Apoptosis in Rat Hepatocytes." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 32 (2): 303–11. doi:10.1053/jhep.2000.9034.
- Harmsen, S, I Meijerman, J H Beijnen, and J H M Schellens. 2007. "The Role of Nuclear Receptors in Pharmacokinetic Drug-Drug Interactions in Oncology." *Cancer Treatment Reviews* 33 (4). England: 369–80. doi:10.1016/j.ctrv.2007.02.003.
- Hartman, Jessica H, Katie Knott, and Grover P Miller. 2014. "CYP2E1 Hydroxylation of Aniline Involves Negative Cooperativity." *Biochemical Pharmacology* 87 (3). Elsevier Inc.: 523–33. doi:10.1016/j.bcp.2013.12.003.
- Hashizume, Tsuneo, Sumie Yoshitomi, Satoru Asahi, Rieko Uematsu, Shigeo Matsumura, Fumio Chatani, and Hiroaki Oda. 2010. "Advantages of Human Hepatocyte-Derived Transformants Expressing a Series of Human Cytochrome p450 Isoforms for Genotoxicity Examination." *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology* 116 (2): 488–97. doi:10.1093/toxsci/kfq154.
- Hasler, J A. "Pharmacogenetics of Cytochromes P450." *Molecular Aspects of Medicine* 20 (1-2): 12–24, 25–137. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10575648>.
- Hayes, John D, Jack U Flanagan, and Ian R Jowsey. 2005. "Glutathione Transferases." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45 (January): 51–88. doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857.
- Heidel, S M, C J Czuprynski, and C R Jefcoate. 1998. "Bone Marrow Stromal Cells Constitutively Express High Levels of Cytochrome P4501B1 That Metabolize 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene." *Molecular Pharmacology* 54 (6): 1000–1006. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9855628>.
- Heidenreich, Barbara, P Sivaramakrishna Rachakonda, Kari Hemminki, and Rajiv Kumar. 2014. "TERT Promoter Mutations in Cancer Development." *Current Opinion in Genetics & Development* 24 (February): 30–37. doi:10.1016/j.gde.2013.11.005.
- Hewitt, N J, and P Hewitt. 2004. "Phase I and II Enzyme Characterization of Two Sources of HepG2 Cell Lines." *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems* 34 (3): 243–56. doi:10.1080/00498250310001657568.
- Hickman, D, J P Wang, Y Wang, and J D Unadkat. 1998. "Evaluation of the Selectivity of In Vitro Probes and Suitability of Organic Solvents for the Measurement of Human Cytochrome P450 Monooxygenase Activities." *Drug Metabolism and Disposition: The*

Biological Fate of Chemicals 26 (3): 207–15.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9492382>.

Hillmen, P, M Bessler, P J Mason, W M Watkins, and L Luzzatto. 1993. "Specific Defect in N-Acetylglucosamine Incorporation in the Biosynthesis of the Glycosylphosphatidylinositol Anchor in Cloned Cell Lines from Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 5272–76. doi:10.1073/pnas.90.11.5272.

Hilscherova, Klara, Paul D Jones, Tannia Gracia, John L Newsted, Xiaowei Zhang, J T Sanderson, Richard M K Yu, Rudolf S S Wu, and John P Giesy. 2004. "Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR." *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology* 81 (1): 78–89. doi:10.1093/toxsci/kfh191.

Hofmann, Marco H, Julia K Blievernicht, Kathrin Klein, Tanja Saussele, Elke Schaeffeler, Matthias Schwab, and Ulrich M Zanger. 2008. "Aberrant Splicing Caused by Single Nucleotide Polymorphism c.516G>T [Q172H], a Marker of CYP2B6*6, Is Responsible for Decreased Expression and Activity of CYP2B6 in Liver." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 325 (1): 284–92. doi:10.1124/jpet.107.133306.

Homma, K, Y Yoshida, and A Nakano. 2000. "Evidence for Recycling of Cytochrome P450 Sterol 14-Demethylase from the Cis-Golgi Compartment to the Endoplasmic Reticulum (ER) upon Saturation of the ER-Retention Mechanism." *Journal of Biochemistry* 127 (5). JAPAN: 747–54.

Honkakoski, P, I Zelko, T Sueyoshi, and M Negishi. 1998. "The Nuclear Orphan Receptor CAR-Retinoid X Receptor Heterodimer Activates the Phenobarbital-Responsive Enhancer Module of the CYP2B Gene." *Molecular and Cellular Biology* 18 (10): 5652–58. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=109151&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Hothorn, Ludwig A., Kerstin Reisinger, Thorsten Wolf, Albrecht Poth, Dagmar Fieblinger, Manfred Liebsch, and Ralph Pirow. 2013. "Statistical Analysis of the Hen's Egg Test for Micronucleus Induction (HET-MN Assay)." *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. doi:10.1016/j.mrgentox.2013.04.023.

Howard, Lisa A, Jasjit S Ahluwalia, Shih-Ku Lin, Edward M Sellers, and Rachel F Tyndale. 2003. "CYP2E1*1D Regulatory Polymorphism: Association with Alcohol and Nicotine Dependence." *Pharmacogenetics* 13 (6): 321–28. doi:10.1097/01.fpc.0000054090.48725.a2.

Hsieh, D P, J M Cullen, L S Hsieh, Y Shao, and B H Ruebner. 1985. "Cancer Risks Posed by Aflatoxin M1." *Princess Takamatsu Symposia* 16 (January): 57–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3939566>.

- Huang, C S, C Y Shen, K J Chang, S M Hsu, and H D Chern. 1999. "Cytochrome P4501A1 Polymorphism as a Susceptibility Factor for Breast Cancer in Postmenopausal Chinese Women in Taiwan." *British Journal of Cancer* 80 (11): 1838–43. doi:10.1038/sj.bjc.6690608.
- Huang, Z, P Roy, and D J Waxman. 2000. "Role of Human Liver Microsomal CYP3A4 and CYP2B6 in Catalyzing N-Dechloroethylation of Cyclophosphamide and Ifosfamide." *Biochemical Pharmacology* 59 (8): 961–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10692561>.
- Huang, Zhishan, John T Pinto, Haiteng Deng, and John P Richie. 2008. "Inhibition of Caspase-3 Activity and Activation by Protein Glutathionylation." *Biochemical Pharmacology* 75 (11): 2234–44. doi:10.1016/j.bcp.2008.02.026.
- Huber, W W, B Grasl-Kraupp, and R Schulte-Hermann. 1996. "Hepatocarcinogenic Potential of di(2-Ethylhexyl)phthalate in Rodents and Its Implications on Human Risk." *Critical Reviews in Toxicology* 26 (4): 365–481. doi:10.3109/10408449609048302.
- Hurst, Christopher H, and David J Waxman. 2004. "Environmental Phthalate Monoesters Activate Pregnane X Receptor-Mediated Transcription." *Toxicology and Applied Pharmacology* 199 (3): 266–74. doi:10.1016/j.taap.2003.11.028.
- Ingelman-Sundberg, M, M J Ronis, K O Lindros, E Eliasson, and A Zhukov. 1994. "Ethanol-Inducible Cytochrome P4502E1: Regulation, Enzymology and Molecular Biology." *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire). Supplement 2* (January): 131–39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8974327>.
- Isom, H C, T Secott, I Georgoff, C Woodworth, and J Mummaw. 1985. "Maintenance of Differentiated Rat Hepatocytes in Primary Culture." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (10): 3252–56. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=397753&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- James, S L. 1995. "Role of Nitric Oxide in Parasitic Infections." *Microbiol Rev* 59: 533–47. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8531884.
- Jamil, Kaiser, Abjal Pasha Shaik, M Mahboob, and D Krishna. 2004. "Effect of Organophosphorus and Organochlorine Pesticides (monochrotophos, Chlorpyrifos, Dimethoate, and Endosulfan) on Human Lymphocytes in-Vitro." *Drug and Chemical Toxicology* 27 (2): 133–44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15198073>.
- Janmohamed, A, C T Dolphin, I R Phillips, and E A Shephard. 2001. "Quantification and Cellular Localization of Expression in Human Skin of Genes Encoding Flavin-Containing Monooxygenases and Cytochromes P450." *Biochemical Pharmacology* 62 (6): 777–86. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11551524>.

- Jayashree, R, and N Vasudevan. 2007. "Organochlorine Pesticide Residues in Ground Water of Thiruvallur District, India." *Environmental Monitoring and Assessment* 128 (1-3): 209–15. doi:10.1007/s10661-006-9306-6.
- Jetten, M J A, J C S Kleinjans, S M Claessen, C Chesné, and J H M van Delft. 2013. "Baseline and Genotoxic Compound Induced Gene Expression Profiles in HepG2 and HepaRG Compared to Primary Human Hepatocytes." *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 27 (7): 2031–40. doi:10.1016/j.tiv.2013.07.010.
- Ji, Kyunghye, Toshiaki Kogame, Kyungho Choi, Xin Wang, Jinyoung Lee, Yoshihito Taniguchi, and Shunichi Takeda. 2009. "A Novel Approach Using DNA-Repair-Deficient Chicken DT40 Cell Lines for Screening and Characterizing the Genotoxicity of Environmental Contaminants." *Environmental Health Perspectives* 117 (11): 1737–44. doi:10.1289/ehp.0900842.
- Johnson, Donna, and Richard Walmsley. 2013. "Histone-Deacetylase Inhibitors Produce Positive Results in the GADD45a-GFP GreenScreen HC Assay." *Mutation Research* 751 (2). Elsevier B.V.: 96–100. doi:10.1016/j.mrgentox.2012.12.009.
- Johnson, Eric F, Mei-Hui Hsu, Uzen Savas, and Keith J Griffin. 2002. "Regulation of P450 4A Expression by Peroxisome Proliferator Activated Receptors." *Toxicology* 181-182 (December). Ireland: 203–6.
- Johnstone, Elaine, Neal Benowitz, Anna Cargill, Robyn Jacob, Lesley Hinks, Ian Day, Mike Murphy, and Robert Walton. 2006. "Determinants of the Rate of Nicotine Metabolism and Effects on Smoking Behavior." *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 80 (4): 319–30. doi:10.1016/j.clpt.2006.06.011.
- Jones, C G, and M A Titheradge. 1996. "Measurement of Metabolic Fluxes through Pyruvate Kinase, Phosphoenolpyruvate Carboxykinase, Pyruvate Dehydrogenase, and Pyruvate Carboxylate in Hepatocytes of Different Acinar Origin." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 326 (2): 202–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8611024>.
- Jorge-Nebert, Lucia F, Zhengwen Jiang, Ranajit Chakraborty, Joanna Watson, Li Jin, Stephen T McGarvey, Ranjan Deka, and Daniel W Nebert. 2010. "Analysis of Human CYP1A1 and CYP1A2 Genes and Their Shared Bidirectional Promoter in Eight World Populations." *Human Mutation* 31 (1): 27–40. doi:10.1002/humu.21132.
- Jossé, Rozenn, Caroline Aninat, Denise Glaise, Julie Dumont, Valérie Fessard, Fabrice Morel, Jean-Michel Poul, Christiane Guguen-Guillouzo, and André Guillouzo. 2008. "Long-Term Functional Stability of Human HepaRG Hepatocytes and Use for Chronic Toxicity and Genotoxicity Studies." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 36 (6): 1111–18. doi:10.1124/dmd.107.019901.

- Jossé, Rozenn, Alexandra Rogue, Elisabeth Lorge, and André Guillouzo. 2012. "An Adaptation of the Human HepaRG Cells to the in Vitro Micronucleus Assay." *Mutagenesis* 27 (3): 295–304. doi:10.1093/mutage/ger076.
- Jover, R, R Bort, M J Gómez-Lechón, and J V Castell. 1998. "Re-Expression of C/EBP Alpha Induces CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 Genes in HepG2 Cells." *FEBS Letters* 431 (2): 227–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9708908>.
- Jover, Ramiro, Marta Moya, and M José Gómez-Lechón. 2009. "Transcriptional Regulation of Cytochrome p450 Genes by the Nuclear Receptor Hepatocyte Nuclear Factor 4-Alpha." *Current Drug Metabolism* 10 (5): 508–19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19689247>.
- Jugert, F K, R Agarwal, A Kuhn, D R Bickers, H F Merk, and H Mukhtar. 1994. "Multiple Cytochrome P450 Isozymes in Murine Skin: Induction of P450 1A, 2B, 2E, and 3A by Dexamethasone." *The Journal of Investigative Dermatology* 102 (6). UNITED STATES: 970–75.
- Jungermann, K, and T Kietzmann. 2000. "Oxygen: Modulator of Metabolic Zonation and Disease of the Liver." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 31: 255–60. doi:10.1002/hep.510310201.
- Kadokol, A, S S Ghosh, B S Sappal, G Sharma, J R Chowdhury, and N R Chowdhury. 2000. "Genetic Lesions of Bilirubin Uridine-Diphosphoglucuronate Glucuronosyltransferase (UGT1A1) Causing Crigler-Najjar and Gilbert Syndromes: Correlation of Genotype to Phenotype." *Human Mutation* 16 (4): 297–306. doi:10.1002/1098-1004(200010)16:4<297::AID-HUMU2>3.0.CO;2-Z.
- Kandemir, O, A Polat, and A Kaya. 2002. "Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Chronic Viral Hepatitis and Its Relation with Histological Severity of Disease." *Journal of Viral Hepatitis* 9: 419–23.
- Kapoor, Nidhi, Aditya B Pant, Alok Dhawan, Uppendra N Dwivedi, Yogendra K Gupta, Prahlad K Seth, and Devendra Parmar. 2006. "Differences in Sensitivity of Cultured Rat Brain Neuronal and Glial Cytochrome P450 2E1 to Ethanol." *Life Sciences* 79 (16): 1514–22. doi:10.1016/j.lfs.2006.04.023.
- Karakurt, Serdar, Asli Semiz, Gurbet Celik, Ayşe Mine Gencler-Ozkan, Alaattin Sen, and Orhan Adali. 2013. "Epilobium Hirsutum Alters Xenobiotic Metabolizing CYP1A1, CYP2E1, NQO1 and GPx Activities, mRNA and Protein Levels in Rats." *Pharmaceutical Biology* 51 (5): 650–58. doi:10.3109/13880209.2012.762404.
- Kaufmann, W, K Deckardt, R H McKee, J H Butala, and R Bahnemann. 2002. "Tumor Induction in Mouse Liver: Di-Isononyl Phthalate Acts via Peroxisome Proliferation." *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP* 36 (2): 175–83. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12460752>.

- Kaur, Pushpinder, Samson Mani, Marie-Pierre Cros, Jean-Yves Scoazec, Isabelle Chemin, Pierre Hainaut, and Zdenko Herceg. 2012. "Epigenetic Silencing of sFRP1 Activates the Canonical Wnt Pathway and Contributes to Increased Cell Growth and Proliferation in Hepatocellular Carcinoma." *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 33 (2): 325–36. doi:10.1007/s13277-012-0331-5.
- Keshavarzian, Ali, Ashkan Farhadi, Christopher B Forsyth, Jayanthi Rangan, Shriram Jakate, Maliha Shaikh, Ali Banan, and Jeremy Z Fields. 2009. "Evidence That Chronic Alcohol Exposure Promotes Intestinal Oxidative Stress, Intestinal Hyperpermeability and Endotoxemia prior to Development of Alcoholic Steatohepatitis in Rats." *Journal of Hepatology* 50 (3): 538–47. doi:10.1016/j.jhep.2008.10.028.
- Khoury, Laure, Daniel Zalko, and Marc Audebert. 2013. "Validation of High-Throughput Genotoxicity Assay Screening Using c H2AX In-Cell Western Assay on" 746 (April). doi:10.1002/em.
- Kirchheiner, Julia, Christian Klein, Ingolf Meineke, Johanna Sasse, Ulrich M Zanger, Thomas E Mürdter, Ivar Roots, and Jürgen Brockmöller. 2003. "Bupropion and 4-OH-Bupropion Pharmacokinetics in Relation to Genetic Polymorphisms in CYP2B6." *Pharmacogenetics* 13 (10): 619–26. doi:10.1097/01.fpc.0000054125.14659.d0.
- Kirkland, David, Marilyn Aardema, Leigh Henderson, and Lutz Müller. 2005. "Evaluation of the Ability of a Battery of Three in Vitro Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens I. Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity." *Mutation Research* 584 (1-2): 1–256. doi:10.1016/j.mrgentox.2005.02.004.
- Kirkland, David, Peter Kasper, Lutz Müller, Raffaella Corvi, and Günter Speit. 2008. "Recommended Lists of Genotoxic and Non-Genotoxic Chemicals for Assessment of the Performance of New or Improved Genotoxicity Tests: A Follow-up to an ECVAM Workshop." *Mutation Research* 653 (1-2): 99–108. doi:10.1016/j.mrgentox.2008.03.008.
- Kirkland, David, Stefan Pfuhler, David Tweats, Marilyn Aardema, Raffaella Corvi, Firouz Darroudi, Azeddine Elhajouji, et al. 2007. "How to Reduce False Positive Results When Undertaking in Vitro Genotoxicity Testing and Thus Avoid Unnecessary Follow-up Animal Tests: Report of an ECVAM Workshop." *Mutation Research* 628 (1): 31–55. doi:10.1016/j.mrgentox.2006.11.008.
- Kisselev, Pyotr, Wolf-hagen Schunck, Ivar Roots, and Dieter Schwarz. 2005. "Association of CYP1A1 Polymorphisms with Differential Metabolic Activation of 17 B -Estradiol and Estrone Activation of 17 B -Estradiol and Estrone," no. 7: 2972–78.
- Kitamura, Shigeyuki, Teruhisa Kato, Mitsuru Iida, Norimasa Jinno, Tomoharu Suzuki, Shigeru Ohta, Nariaki Fujimoto, Hideki Hanada, Keiko Kashiwagi, and Akihiko Kashiwagi. 2005. "Anti-Thyroid Hormonal Activity of Tetrabromobisphenol A, a Flame Retardant, and Related Compounds: Affinity to the Mammalian Thyroid Hormone Receptor, and Effect

- on Tadpole Metamorphosis." *Life Sciences* 76 (14): 1589–1601. doi:10.1016/j.lfs.2004.08.030.
- Klein, Kathrin, Thomas Lang, Tanja Saussele, Eduardo Barbosa-Sicard, Wolf-Hagen Schunck, Michel Eichelbaum, Matthias Schwab, and Ulrich M Zanger. 2005. "Genetic Variability of CYP2B6 in Populations of African and Asian Origin: Allele Frequencies, Novel Functional Variants, and Possible Implications for Anti-HIV Therapy with Efavirenz." *Pharmacogenetics and Genomics* 15 (12): 861–73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16272958>.
- Kliewer, Steven A, Bryan Goodwin, and Timothy M Willson. 2002. "The Nuclear Pregnane X Receptor: A Key Regulator of Xenobiotic Metabolism." *Endocrine Reviews* 23 (5). United States: 687–702. doi:10.1210/er.2001-0038.
- Knasmüller, S, W Parzefall, R Sanyal, S Ecker, C Schwab, M Uhl, V Mersch-Sundermann, et al. 1998. "Use of Metabolically Competent Human Hepatoma Cells for the Detection of Mutagens and Antimutagens." *Mutation Research* 402 (1-2): 185–202. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9675276>.
- Knockaert, Laetitia, Véronique Descatoire, Nathalie Vadrot, Bernard Fromenty, and Marie-Anne Robin. 2011. "Mitochondrial CYP2E1 Is Sufficient to Mediate Oxidative Stress and Cytotoxicity Induced by Ethanol and Acetaminophen." *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 25 (2). Elsevier Ltd: 475–84. doi:10.1016/j.tiv.2010.11.019.
- Kocarek, Thomas A, Michael S Dahn, Hongbo Cai, Stephen C Strom, and Nancy A Mercer-Haines. 2002. "Regulation of CYP2B6 and CYP3A Expression by Hydroxymethylglutaryl Coenzyme A Inhibitors in Primary Cultured Human Hepatocytes." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 30 (12). United States: 1400–1405.
- Koop, D R, E T Morgan, G E Tarr, and M J Coon. 1982. "Purification and Characterization of a Unique Isozyme of Cytochrome P-450 from Liver Microsomes of Ethanol-Treated Rabbits." *The Journal of Biological Chemistry* 257 (14): 8472–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7085677>.
- Kreth, K, K Kovar, M Schwab, and U M Zanger. 2000. "Identification of the Human Cytochromes P450 Involved in the Oxidative Metabolism of 'Ecstasy'-Related Designer Drugs." *Biochemical Pharmacology* 59 (12): 1563–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10799653>.
- Krishna, D R, and U Klotz. 1994. "Extrahepatic Metabolism of Drugs in Humans." *Clinical Pharmacokinetics* 26 (2). NEW ZEALAND: 144–60. doi:10.2165/00003088-199426020-00007.
- Krüger, Christopher T, Mareike Hofmann, and Andrea Hartwig. 2014. "The in Vitro PIG-A Gene Mutation Assay: Mutagenicity Testing via Flow Cytometry Based on the

- Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Status of TK6 Cells." *Archives of Toxicology*, November. doi:10.1007/s00204-014-1413-5.
- Krumdieck, C L, J E dos Santos, and K J Ho. 1980. "A New Instrument for the Rapid Preparation of Tissue Slices." *Analytical Biochemistry* 104 (1): 118–23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6770714>.
- Kusano, K, M Sakaguchi, N Kagawa, M R Waterman, and T Omura. 2001. "Microsomal p450s Use Specific Proline-Rich Sequences for Efficient Folding, but Not for Maintenance of the Folded Structure." *Journal of Biochemistry* 129 (2). Japan: 259–69.
- Laethem, R M, M Balazy, J R Falck, C L Laethem, and D R Koop. 1993. "Formation of 19(S)-, 19(R)-, and 18(R)-Hydroxyeicosatetraenoic Acids by Alcohol-Inducible Cytochrome P450 2E1." *The Journal of Biological Chemistry* 268 (17): 12912–18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8509425>.
- Lagadic-Gossmann, D, C Lerche, M Rissel, F Joannard, M Galisteo, A Guillouzo, and L Corcos. 2000. "The Induction of the Human Hepatic CYP2E1 Gene by Interleukin 4 Is Transcriptional and Regulated by Protein Kinase C." *Cell Biology and Toxicology* 16 (4): 221–33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11101004>.
- Lainé, F, J M Reymann, F Morel, S Langouët, M Perrin, a Guillygomarc'h, P Brissot, et al. 2006. "Effects of Phlebotomy Therapy on Cytochrome P450 2e1 Activity and Oxidative Stress Markers in Dysmetabolic Iron Overload Syndrome: A Randomized Trial." *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 24 (8): 1207–13. doi:10.1111/j.1365-2036.2006.03116.x.
- Laios, Alexandros, Sharon O'Toole, Richard Flavin, Cara Martin, Lynn Kelly, Martina Ring, Stephen P Finn, et al. 2008. "Potential Role of miR-9 and miR-223 in Recurrent Ovarian Cancer." *Molecular Cancer* 7 (January): 35. doi:10.1186/1476-4598-7-35.
- Lamba, Vishal, Jatinder Lamba, Kazuto Yasuda, Stephen Strom, Julio Davila, Michael L Hancock, James D Fackenthal, et al. 2003. "Hepatic CYP2B6 Expression: Gender and Ethnic Differences and Relationship to CYP2B6 Genotype and CAR (constitutive Androstane Receptor) Expression." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 307 (3): 906–22. doi:10.1124/jpet.103.054866.
- Lang, T, K Klein, J Fischer, A K Nüssler, P Neuhaus, U Hofmann, M Eichelbaum, M Schwab, and U M Zanger. 2001. "Extensive Genetic Polymorphism in the Human CYP2B6 Gene with Impact on Expression and Function in Human Liver." *Pharmacogenetics* 11 (5): 399–415. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11470993>.
- Langlois, R G, W L Bigbee, and R H Jensen. 1986. "Measurements of the Frequency of Human Erythrocytes with Gene Expression Loss Phenotypes at the Glycophorin A Locus." *Human Genetics* 74: 353–62. doi:10.1007/BF00280485.

- Langouet, S, L Corcos, Z Abdel-Razzak, P Loyer, B Ketterer, and A Guillouzo. 1995. "Up-Regulation of Glutathione S-Transferases Alpha by Interleukin 4 in Human Hepatocytes in Primary Culture." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 216 (3): 793–800. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7488195>.
- Lawrence, Richard A, and Raymond F Burk. 2012. "Glutathione Peroxidase Activity in Selenium-Deficient Rat Liver. 1976." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 425 (3): 503–9. doi:10.1016/j.bbrc.2012.08.016.
- Le Hégarat, Ludovic, Julie Dumont, Rozenn Josse, Sylvie Huet, Rachelle Lanceleur, Annick Mourot, Jean-Michel Poul, Christiane Guguen-Guillouzo, André Guillouzo, and Valérie Fessard. 2010. "Assessment of the Genotoxic Potential of Indirect Chemical Mutagens in HepaRG Cells by the Comet and the Cytokinesis-Block Micronucleus Assays." *Mutagenesis* 25 (6): 555–60. doi:10.1093/mutage/geq039.
- Le Hégarat, Ludovic, Annick Mourot, Sylvie Huet, Lucie Vasseur, Sandrine Camus, Christophe Chesné, and Valérie Fessard. 2014. "Performance of Comet and Micronucleus Assays in Metabolic Competent HepaRG Cells to Predict in Vivo Genotoxicity." *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 138 (2): 300–309. doi:10.1093/toxsci/kfu004.
- Lee, Anthony J, May Xiaoxin Cai, Paul E Thomas, Allan H Conney, and Bao Ting Zhu. 2003. "Characterization of the Oxidative Metabolites of 17beta-Estradiol and Estrone Formed by 15 Selectively Expressed Human Cytochrome p450 Isoforms." *Endocrinology* 144 (8): 3382–98. doi:10.1210/en.2003-0192.
- Legendre, Claire, Tamaki Hori, Pascal Loyer, Caroline Aninat, Seiichi Ishida, Denise Glaise, Catherine Lucas-Clerc, et al. 2009. "Drug-Metabolising Enzymes Are down-Regulated by Hypoxia in Differentiated Human Hepatoma HepaRG Cells: HIF-1alpha Involvement in CYP3A4 Repression." *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 45 (16): 2882–92. doi:10.1016/j.ejca.2009.07.010.
- Levin, W, P E Thomas, N Oldfield, and D E Ryan. 1986. "N-Demethylation of N-Nitrosodimethylamine Catalyzed by Purified Rat Hepatic Microsomal Cytochrome P-450: Isozyme Specificity and Role of Cytochrome b5." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 248 (1): 158–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3729411>.
- Li, Haishan, and Hongbing Wang. 2010. "Activation of Xenobiotic Receptors: Driving into the Nucleus." *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 6 (4). England: 409–26. doi:10.1517/17425251003598886.
- Li, Jing, Vincent Menard, Rebekah L Benish, Richard J Jurevic, Chantal Guillemette, Mark Stoneking, Peter A Zimmerman, and Rajeev K Mehlotra. 2012. "Worldwide Variation in Human Drug-Metabolism Enzyme Genes CYP2B6 and UGT2B7: Implications for HIV/AIDS Treatment." *Pharmacogenomics* 13 (5): 555–70. doi:10.2217/pgs.11.160.

- Lieber, C S. 1999. "Microsomal Ethanol-Oxidizing System (MEOS): The First 30 Years (1968-1998)--a Review." *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 23 (6): 991-1007. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10397283>.
- Lin, Yvonne S, Amy L S Dowling, Sean D Quigley, Federico M Farin, Jiong Zhang, Jatinder Lamba, Erin G Schuetz, and Kenneth E Thummel. 2002. "Co-Regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and Contribution to Hepatic and Intestinal Midazolam Metabolism." *Molecular Pharmacology* 62 (1): 162-72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12065767>.
- Lister, Ryan, Mattia Pelizzola, Robert H Downen, R David Hawkins, Gary Hon, Julian Tonti-Filippini, Joseph R Nery, et al. 2009. "Human DNA Methylomes at Base Resolution Show Widespread Epigenomic Differences." *Nature* 462: 315-22. doi:10.1038/nature08514.
- Loeper, J, V Descatoire, M Maurice, P Beaune, G Feldmann, D Larrey, and D Pessayre. 1990. "Presence of Functional Cytochrome P-450 on Isolated Rat Hepatocyte Plasma Membrane." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 11 (5). UNITED STATES: 850-58.
- Lombardo, L, R Pellitteri, M Balazy, and V Cardile. 2008. "Induction of Nuclear Receptors and Drug Resistance in the Brain Microvascular Endothelial Cells Treated with Antiepileptic Drugs." *Current Neurovascular Research* 5: 82-92. doi:10.2174/156720208784310196.
- Lorge, E, M Hayashi, S Albertini, and D Kirkland. 2008. "Comparison of Different Methods for an Accurate Assessment of Cytotoxicity in the in Vitro Micronucleus Test. I. Theoretical Aspects." *Mutation Research* 655 (1-2): 1-3. doi:10.1016/j.mrgentox.2008.06.003.
- Lu, Yuan, Stacie Bratton, Jean-Marie Heydel, and Anna Radomska-Pandya. 2008. "Effect of Retinoids on UDP-Glucuronosyltransferase 2B7 mRNA Expression in Caco-2 Cells." *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 23 (5): 364-72. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3129696&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lu, Yuquan, Kanehisa Morimoto, Tatsuya Takeshita, Toru Takeuchi, and Takeshi Saito. 2000. "Genotoxic Effects of a-Endosulfan and f3-Endosulfan on Human HepG2 Cells" 108 (6): 559-61.
- Lucas, D, F Berthou, C Girre, F Poitrenaud, and J F Ménez. 1993. "High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Chlorzoxazone and 6-Hydroxychlorzoxazone in Serum: A Tool for Indirect Evaluation of Cytochrome P4502E1 Activity in Humans." *Journal of Chromatography* 622 (1): 79-86. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8120116>.
- Luo, Gang, Mark Cunningham, Sean Kim, Tim Burn, Jianrong Lin, Michael Sinz, Geraldine Hamilton, et al. 2002. "CYP3A4 Induction by Drugs: Correlation between a Pregnane X Receptor Reporter Gene Assay and CYP3A4 Expression in Human Hepatocytes." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 30 (7): 795-804. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12065438>.

- Ma, Xiaochao, Jeffrey R Idle, Kristopher W Krausz, and Frank J Gonzalez. 2005. "Metabolism of Melatonin by Human Cytochromes p450." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 33 (4): 489–94. doi:10.1124/dmd.104.002410.
- Mackenzie, Peter I, Karl Walter Bock, Brian Burchell, Chantal Guillemette, Shin-ichi Ikushiro, Takashi Iyanagi, John O Miners, Ida S Owens, and Daniel W Nebert. 2005. "Nomenclature Update for the Mammalian UDP Glycosyltransferase (UGT) Gene Superfamily." *Pharmacogenetics and Genomics* 15: 677–85. doi:10.1097/01.fpc.0000173483.13689.56.
- Mackenzie, Peter I, Anne Rogers, Joanna Treloar, Bo R Jorgensen, John O Miners, and Robyn Meech. 2008. "Identification of UDP Glycosyltransferase 3A1 as a UDP N-Acetylglucosaminyltransferase." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (52): 36205–10. doi:10.1074/jbc.M807961200.
- Maglich, Jodi M, Catherine M Stoltz, Bryan Goodwin, Diane Hawkins-Brown, John T Moore, and Steven A Kliewer. 2002. "Nuclear Pregnane X Receptor and Constitutive Androstane Receptor Regulate Overlapping but Distinct Sets of Genes Involved in Xenobiotic Detoxification." *Molecular Pharmacology* 62 (3): 638–46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12181440>.
- Mally, Angela, and James Kevin Chipman. 2002. "Non-Genotoxic Carcinogens: Early Effects on Gap Junctions, Cell Proliferation and Apoptosis in the Rat." *Toxicology* 180: 233–48. doi:10.1016/S0300-483X(02)00393-1.
- Manevski, Nenad, Piet Swart, Kamal Kumar Balavenkatraman, Barbara Bertschi, Gian Camenisch, Olivier Kretz, Hilmar Schiller, et al. 2015. "Phase II Metabolism in Human Skin: Skin Explants Show Full Coverage for Glucuronidation, Sulfation, N-Acetylation, Catechol Methylation, and Glutathione Conjugation." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 43 (1): 126–39. doi:10.1124/dmd.114.060350.
- Mansuy, D, J L Boucher, and B Clement. 1995. "On the Mechanism of Nitric Oxide Formation upon Oxidative Cleavage of C = N(OH) Bonds by NO-Synthases and Cytochromes P450." *Biochimie* 77 (7-8). FRANCE: 661–67.
- Manyike, P T, E D Kharasch, T F Kalhorn, and J T Slattery. 2000. "Contribution of CYP2E1 and CYP3A to Acetaminophen Reactive Metabolite Formation." *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 67 (3): 275–82. doi:10.1067/mcp.2000.104736.
- Margison, Geoffrey P, Mauro F Santibáñez Koref, and Andrew C Povey. 2002. "Mechanisms of Carcinogenicity/chemotherapy by O6-Methylguanine." *Mutagenesis* 17: 483–87. doi:10.1093/mutage/17.6.483.
- Martínez-Jiménez, Celia P, M José Gómez-Lechón, José V Castell, and Ramiro Jover. 2005. "Transcriptional Regulation of the Human Hepatic CYP3A4: Identification of a New Distal Enhancer Region Responsive to CCAAT/enhancer-Binding Protein Beta Isoforms

- (liver Activating Protein and Liver Inhibitory Protein)." *Molecular Pharmacology* 67 (6): 2088–2101. doi:10.1124/mol.104.008169.
- McCarver, D G, R Byun, R N Hines, M Hichme, and W Wegenek. 1998. "A Genetic Polymorphism in the Regulatory Sequences of Human CYP2E1: Association with Increased Chlorzoxazone Hydroxylation in the Presence of Obesity and Ethanol Intake." *Toxicology and Applied Pharmacology* 152 (1): 276–81. doi:10.1006/taap.1998.8532.
- McMahon, Michael, Ken Itoh, Masayuki Yamamoto, and John D Hayes. 2003. "Keap1-Dependent Proteasomal Degradation of Transcription Factor Nrf2 Contributes to the Negative Regulation of Antioxidant Response Element-Driven Gene Expression." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (24): 21592–600. doi:10.1074/jbc.M300931200.
- Meerts, I A, J J van Zanden, E A Luijckx, I van Leeuwen-Bol, G Marsh, E Jakobsson, A Bergman, and A Brouwer. 2000. "Potent Competitive Interactions of Some Brominated Flame Retardants and Related Compounds with Human Transthyretin in Vitro." *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 56 (1): 95–104. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10869457>.
- Mehlotra, Rajeev K, Moses J Bockarie, and Peter A Zimmerman. 2007. "CYP2B6 983T>C Polymorphism Is Prevalent in West Africa but Absent in Papua New Guinea: Implications for HIV/AIDS Treatment." *British Journal of Clinical Pharmacology* 64 (3): 391–95. doi:10.1111/j.1365-2125.2007.02884.x.
- Mehvar, Reza, and Ragini Vuppugalla. 2006. "Hepatic Disposition of the Cytochrome P450 2E1 Marker Chlorzoxazone and Its Hydroxylated Metabolite in Isolated Perfused Rat Livers." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 95 (7): 1414–24. doi:10.1002/jps.20503.
- Mijaljica, Dalibor, Mark Prescott, and Rodney J Devenish. 2006. "Endoplasmic Reticulum and Golgi Complex: Contributions To, and Turnover By, Autophagy." *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 7 (12). Denmark: 1590–95. doi:10.1111/j.1600-0854.2006.00495.x.
- Miksys, Sharon, Caryn Lerman, Peter G Shields, Deborah C Mash, and Rachel F Tyndale. 2003. "Smoking, Alcoholism and Genetic Polymorphisms Alter CYP2B6 Levels in Human Brain." *Neuropharmacology* 45 (1): 122–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12814665>.
- Minsavage, Gary D, Daria P Vorojeikina, and Thomas A Gasiewicz. 2003. "Mutational Analysis of the Mouse Aryl Hydrocarbon Receptor Tyrosine Residues Necessary for Recognition of Dioxin Response Elements." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 412 (1): 95–105. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12646272>.
- Mishin, Vladimir M, Tiina Koivisto, and Charles S Lieber. 1996. "The Determination of Cytochrome P450 2E1-Dependent P -Nitrophenol Hydroxylation by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection" 215 (0030): 212–15.

- Mitrunen, Katja, and Ari Hirvonen. 2003. "Molecular Epidemiology of Sporadic Breast Cancer. The Role of Polymorphic Genes Involved in Oestrogen Biosynthesis and Metabolism." *Mutation Research* 544 (1): 9–41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12888106>.
- Miyamoto, Hirotaka, Satoshi Matsueda, Kotaro Komori, Shintaro Fumoto, Mikiro Nakashima, Naoki Yoshikawa, Haruna Hirata, Kenta Shimokawa, Yuichi Ohwaki, and Koyo Nishida. 2013. "Evaluation for Effect of Hypothermia on the Disposition of 4-Nitrophenol in Rats by in-Vitro Metabolism Study and Rat Liver Perfusion System." *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 65 (10): 1536–40. doi:10.1111/jphp.12130.
- Miyoshi, Yasuo, Yuri Takahashi, Chiyomi Egawa, and Shinzaburo Noguchi. "Breast Cancer Risk Associated with CYP1A1 Genetic Polymorphisms in Japanese Women." *The Breast Journal* 8 (4): 209–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12100112>.
- Moncion, Arlette, Nhu Trai Truong, Alessio Garrone, Philippe Beaune, Robert Barouki, Isabelle De Waziers, Nhu Trai, and Isabelle De Waziers. 2002. "Identification of a 16-Nucleotide Sequence That Mediates Post-Transcriptional Regulation of Rat CYP2E1 by Insulin." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (48): 45904–10. doi:10.1074/jbc.M207841200.
- Moore, L B, D J Parks, S A Jones, R K Bledsoe, T G Consler, J B Stimmel, B Goodwin, et al. 2000. "Orphan Nuclear Receptors Constitutive Androstane Receptor and Pregnane X Receptor Share Xenobiotic and Steroid Ligands." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (20). UNITED STATES: 15122–27. doi:10.1074/jbc.M001215200.
- Morel, F, O Fardel, D J Meyer, S Langouet, K S Gilmore, B Meunier, C P Tu, T W Kensler, B Ketterer, and A Guillouzo. 1993. "Preferential Increase of Glutathione S-Transferase Class Alpha Transcripts in Cultured Human Hepatocytes by Phenobarbital, 3-Methylcholanthrene, and Dithiolethiones." *Cancer Research* 53 (2): 231–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8417813>.
- Moyer, J. 1985. "P-NITROPHENOL A Microsomal Oxidation," 548–52.
- Müller-Tegethoff, K, P Kasper, and L Müller. 1995. "Evaluation Studies on the in Vitro Rat Hepatocyte Micronucleus Assay." *Mutation Research* 335 (3): 293–307. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8524345>.
- Nebert, D W, and F J Gonzalez. 1987. "P450 Genes: Structure, Evolution, and Regulation." *Annual Review of Biochemistry* 56 (January): 945–93. doi:10.1146/annurev.bi.56.070187.004501.
- Nelson, D R. 1998. "Cytochrome P450 Nomenclature." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 107. United States: 15–24. doi:10.1385/0-89603-519-0:15.
- . 1999. "Cytochrome P450 and the Individuality of Species." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 369 (1). UNITED STATES: 1–10. doi:10.1006/abbi.1999.1352.

- Nelson, David R. 2009. "The Cytochrome p450 Homepage." *Human Genomics* 4 (1). England: 59–65.
- Neve, E P, and M Ingelman-Sundberg. 1999. "A Soluble NH(2)-Terminally Truncated Catalytically Active Form of Rat Cytochrome P450 2E1 Targeted to Liver mitochondria(1)." *FEBS Letters* 460 (2). NETHERLANDS: 309–14.
- Neve, Etienne P a, and Magnus Ingelman-Sundberg. 2008. "Intracellular Transport and Localization of Microsomal Cytochrome P450." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392 (6): 1075–84. doi:10.1007/s00216-008-2200-z.
- Nishimura, Noriko, Junzo Yonemoto, Yuichi Miyabara, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, and Chiharu Tohyama. 2005. "Altered Thyroxin and Retinoid Metabolic Response to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin in Aryl Hydrocarbon Receptor-Null Mice." *Archives of Toxicology* 79 (5): 260–67. doi:10.1007/s00204-004-0626-4.
- Novak, R F, and K J Woodcroft. 2000. "The Alcohol-Inducible Form of Cytochrome P450 (CYP 2E1): Role in Toxicology and Regulation of Expression." *Archives of Pharmacal Research* 23 (4): 267–82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10976571>.
- O'Shea, D, S N Davis, R B Kim, and G R Wilkinson. 1994. "Effect of Fasting and Obesity in Humans on the 6-Hydroxylation of Chlorzoxazone: A Putative Probe of CYP2E1 Activity." *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 56 (4): 359–67. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7955797>.
- Oesch-Bartlomowicz, Barbara, Andrea Huelster, Oliver Wiss, Patricia Antoniou-Lipfert, Cornelia Dietrich, Michael Arand, Carsten Weiss, Ernesto Bockamp, and Franz Oesch. 2005. "Aryl Hydrocarbon Receptor Activation by cAMP vs. Dioxin: Divergent Signaling Pathways." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (26). United States: 9218–23. doi:10.1073/pnas.0503488102.
- Oinonen, T, and K O Lindros. 1998. "Zonation of Hepatic Cytochrome P-450 Expression and Regulation." *The Biochemical Journal* 329 (Pt 1 (January): 17–35. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1219009&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Olefsky, J M. 2001. "Nuclear Receptor Minireview Series." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (40). United States: 36863–64. doi:10.1074/jbc.R100047200.
- Olinga, P, M G L Elferink, A L Draaisma, M T Merema, J V Castell, G Pérez, and G M M Groothuis. 2008. "Coordinated Induction of Drug Transporters and Phase I and II Metabolism in Human Liver Slices." *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 33 (4-5): 380–89. doi:10.1016/j.ejps.2008.01.008.
- OMURA, T, and R SATO. 1962. "A New Cytochrome in Liver Microsomes." *The Journal of Biological Chemistry* 237 (April). Not Available: 1375–76.

- OMURA, T., and R. SATO. 1964. "THE CARBON MONOXIDE-BINDING PIGMENT OF LIVER MICROSOMES. I. EVIDENCE." *The Journal of Biological Chemistry* 239: 2370–78.
- Ono, S, T Hatanaka, H Hotta, M Tsutsui, T Satoh, and F J Gonzalez. 1995. "Chlorzoxazone Is Metabolized by Human CYP1A2 as Well as by Human CYP2E1." *Pharmacogenetics* 5 (3): 143–50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7550365>.
- Orans, Jillian, Denise G Teotico, and Matthew R Redinbo. 2005. "The Nuclear Xenobiotic Receptor Pregnane X Receptor: Recent Insights and New Challenges." *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 19 (12). United States: 2891–2900. doi:10.1210/me.2005-0156.
- Pahan, K, B T Smith, A K Singh, and I Singh. 1997. "Cytochrome P-450 2E1 in Rat Liver Peroxisomes: Downregulation by Ischemia/reperfusion-Induced Oxidative Stress." *Free Radical Biology & Medicine* 23 (7). UNITED STATES: 963–71.
- Pajaud, J, C Ribault, I Ben Mosbah, C Rauch, C Henderson, P Bellaud, C Aninat, P Loyer, F Morel, and A Corlu. 2015. "Glutathione Transferases P1/P2 Regulate the Timing of Signaling Pathway Activations and Cell Cycle Progression during Mouse Liver Regeneration." *Cell Death & Disease* 6 (January): e1598. doi:10.1038/cddis.2014.562.
- Pajaud, Julie, Sandeep Kumar, Claudine Rauch, Fabrice Morel, and Caroline Aninat. 2012. "Regulation of Signal Transduction by Glutathione Transferases." *International Journal of Hepatology* 2012 (January): 137676. doi:10.1155/2012/137676.
- Pan, Yu-Zhuo, Wenqing Gao, and Ai-Ming Yu. 2009. "MicroRNAs Regulate CYP3A4 Expression via Direct and Indirect Targeting." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 37 (10). United States: 2112–17. doi:10.1124/dmd.109.027680.
- Pascussi, J M, L Drocourt, S Gerbal-Chaloin, J M Fabre, P Maurel, and M J Vilarem. 2001. "Dual Effect of Dexamethasone on CYP3A4 Gene Expression in Human Hepatocytes. Sequential Role of Glucocorticoid Receptor and Pregnane X Receptor." *European Journal of Biochemistry / FEBS* 268 (24): 6346–58. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11737189>.
- Patten, C J, S M Ning, A Y Lu, and C S Yang. 1986. "Acetone-Inducible Cytochrome P-450: Purification, Catalytic Activity, and Interaction with Cytochrome b5." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 251 (2): 629–38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3800390>.
- Persson, I, I Johansson, and M Ingelman-Sundberg. 1997. "In Vitro Kinetics of Two Human CYP1A1 Variant Enzymes Suggested to Be Associated with Interindividual Differences in Cancer Susceptibility." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 231 (1): 227–30. doi:10.1006/bbrc.1997.6051.

- Peter, R, R Böcker, P H Beaune, M Iwasaki, F P Guengerich, and C S Yang. "Hydroxylation of Chlorzoxazone as a Specific Probe for Human Liver Cytochrome P-450IIE1." *Chemical Research in Toxicology* 3 (6): 566–73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2103328>.
- Petrosillo, G, F M Ruggiero, M Pistolese, and G Paradies. 2001. "Reactive Oxygen Species Generated from the Mitochondrial Electron Transport Chain Induce Cytochrome c Dissociation from Beef-Heart Submitochondrial Particles via Cardiolipin Peroxidation. Possible Role in the Apoptosis." *FEBS Letters* 509 (3): 435–38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11749969>.
- Pfuhler, Stefan, Mick Fellows, Jan van Benthem, Raffaella Corvi, Rodger Curren, Kerry Dearfield, Paul Fowler, et al. 2011. "In Vitro Genotoxicity Test Approaches with Better Predictivity: Summary of an IWGT Workshop." *Mutation Research* 723 (2): 101–7. doi:10.1016/j.mrgentox.2011.03.013.
- Pogribny, Igor P, and Frederick A Beland. 2009. "DNA Hypomethylation in the Origin and Pathogenesis of Human Diseases." *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 66 (14): 2249–61. doi:10.1007/s00018-009-0015-5.
- Pozharitskaya, Olga N, Marina V Karlina, Alexander N Shikov, Vera M Kosman, Marina N Makarova, and Valery G Makarov. 2009. "Determination and Pharmacokinetic Study of Taxifolin in Rabbit Plasma by High-Performance Liquid Chromatography." *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 16 (2-3): 244–51. doi:10.1016/j.phymed.2008.10.002.
- Puga, a, C Ma, and JI Marlowe. 2009. "The Aryl Hydrocarbon Receptor Cross-Talks with Multiple Signal Transduction Pathways." *Biochemical Pharmacology* 77 (4): 713–22. doi:10.1016/j.bcp.2008.08.031.The.
- Qiao, En-Qi, and Hong-Jian Yang. 2014. "Effect of Pregnane X Receptor Expression on Drug Resistance in Breast Cancer." *Oncology Letters* 7: 1191–96. doi:10.3892/ol.2014.1817.
- Quiñones, L, F Berthou, N Varela, B Simon, L Gil, and D Lucas. 1999. "Ethnic Susceptibility to Lung Cancer: Differences in CYP2E1, CYP1A1 and GSTM1 Genetic Polymorphisms between French Caucasian and Chilean Populations." *Cancer Letters* 141 (1-2): 167–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10454258>.
- Radloff, Robert, Alain Gras, Ulrich M Zanger, Cécile Masquelier, Karthik Arumugam, Jean-Claude Karasi, Vic Arendt, Carole Seguin-Devaux, and Kathrin Klein. 2013. "Novel CYP2B6 Enzyme Variants in a Rwandese Population: Functional Characterization and Assessment of in Silico Prediction Tools." *Human Mutation* 34 (5): 725–34. doi:10.1002/humu.22295.
- Ratajewski, Marcin, Aurelia Walczak-Drzewiecka, Anna Sałkowska, and Jarosław Dastyk. 2011. "Aflatoxins Upregulate CYP3A4 mRNA Expression in a Process That Involves the PXR Transcription Factor." *Toxicology Letters* 205 (2). Elsevier Ireland Ltd: 146–53. doi:10.1016/j.toxlet.2011.05.1034.

- Ratanasavanh, D, P Beaune, F Morel, J P Flinois, F P Guengerich, and A Guillouzo. 1991. "Intralobular Distribution and Quantitation of Cytochrome P-450 Enzymes in Human Liver as a Function of Age." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 13 (6): 1142–51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1904834>.
- Raucy, J L, J M Lasker, J C Kraner, D E Salazar, C S Lieber, and G B Corcoran. 1991. "Induction of Cytochrome P450IIE1 in the Obese Overfed Rat." *Molecular Pharmacology* 39 (3): 275–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2005876>.
- Raucy, Judy L, and Jerome M Lasker. 2013. "Cell-Based Systems to Assess Nuclear Receptor Activation and Their Use in Drug Development." *Drug Metabolism Reviews* 45 (1): 101–9. doi:10.3109/03602532.2012.737333.
- Rencurel, Franck, Marc Foretz, Michel R Kaufmann, Deborah Stroka, Renate Looser, Isabelle Leclerc, Gabriela da Silva Xavier, Guy A Rutter, Benoit Viollet, and Urs A Meyer. 2006. "Stimulation of AMP-Activated Protein Kinase Is Essential for the Induction of Drug Metabolizing Enzymes by Phenobarbital in Human and Mouse Liver." *Molecular Pharmacology* 70: 1925–34. doi:10.1124/mol.106.029421.
- Rendic, Slobodan, and F Peter Guengerich. 2012. "Contributions of Human Enzymes in Carcinogen Metabolism." *Chemical Research in Toxicology* 25 (7). United States: 1316–83. doi:10.1021/tx300132k.
- Rivedal, Edgar, and Edward Leithe. 2008. "The Benzene Metabolite Trans,trans-Muconaldehyde Blocks Gap Junction Intercellular Communication by Cross-Linking connexin43." *Toxicology and Applied Pharmacology* 232 (3): 463–68. doi:10.1016/j.taap.2008.07.022.
- Robin, M a, H K Anandatheerthavarada, J K Fang, M Cudic, L Otvos, and N G Avadhani. 2001. "Mitochondrial Targeted Cytochrome P450 2E1 (P450 MT5) Contains an Intact N Terminus and Requires Mitochondrial Specific Electron Transfer Proteins for Activity." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (27): 24680–89. doi:10.1074/jbc.M100363200.
- Robin, M A, M Maratrat, J Loeper, A M Durand-Schneider, M Tinel, F Ballet, P Beaune, G Feldmann, and D Pessayre. 1995. "Cytochrome P4502B Follows a Vesicular Route to the Plasma Membrane in Cultured Rat Hepatocytes." *Gastroenterology* 108 (4). UNITED STATES: 1110–23.
- Robin, Marie-Anne, Hindupur K Anandatheerthavarada, Gopa Biswas, Naresh Babu V Sepuri, Donna M Gordon, Debkumar Pain, and Narayan G Avadhani. 2002. "Bimodal Targeting of Microsomal CYP2E1 to Mitochondria through Activation of an N-Terminal Chimeric Signal by cAMP-Mediated Phosphorylation." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (43): 40583–93. doi:10.1074/jbc.M203292200.
- Rodríguez-Antona, C, R Bort, R Jover, N Tindberg, M Ingelman-Sundberg, M J Gómez-Lechón, and J V Castell. 2003. "Transcriptional Regulation of Human CYP3A4 Basal Expression by

- CCAAT Enhancer-Binding Protein Alpha and Hepatocyte Nuclear Factor-3 Gamma." *Molecular Pharmacology* 63 (5): 1180–89. doi:10.1124/mol.63.5.1180.
- Rong, Minhua, Gang Chen, and Yiwu Dang. 2013. "Increased miR-221 Expression in Hepatocellular Carcinoma Tissues and Its Role in Enhancing Cell Growth and Inhibiting Apoptosis in Vitro." *BMC Cancer* 13 (January): 21. doi:10.1186/1471-2407-13-21.
- Ronis, M J, I Johansson, K Hultenby, J Lagercrantz, H Glaumann, and M Ingelman-Sundberg. 1991. "Acetone-Regulated Synthesis and Degradation of Cytochrome P450E1 and Cytochrome P450B1 in Rat Liver [corrected]." *European Journal of Biochemistry / FEBS* 198 (2). GERMANY: 383–89.
- Ross, A Catharine, and Reza Zolfaghari. 2011. "Cytochrome P450s in the Regulation of Cellular Retinoic Acid Metabolism." *Annual Review of Nutrition* 31 (August). United States: 65–87. doi:10.1146/annurev-nutr-072610-145127.
- Rotger, M, H Tegude, S Colombo, M Cavassini, H Furrer, L Décosterd, J Bliedernicht, et al. 2007. "Predictive Value of Known and Novel Alleles of CYP2B6 for Efavirenz Plasma Concentrations in HIV-Infected Individuals." *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 81 (4): 557–66. doi:10.1038/sj.clpt.6100072.
- Rothkamm, K, S Horn, H Scherthan, U Rössler, A De Amicis, S Barnard, Ulrike Kulka, et al. 2013. "Laboratory Intercomparison on the Gamma-H2AX Foci Assay." *Radiation Research* 180 (2). United States: 149–55. doi:10.1667/RR3238.1.
- Rubin, Katarina, Annika Janefeldt, Linda Andersson, Zsafia Berke, Ken Grime, and Tommy B Andersson. 2015. "HepaRG Cells as Human-Relevant in Vitro Model to Study the Effects of Inflammatory Stimuli on Cytochrome P450 Isoenzymes." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 43 (1): 119–25. doi:10.1124/dmd.114.059246.
- Rugstad, H E, and E Dybing. 1975. "Glucuronidation in Cultures of Human Skin Epithelial Cells." *European Journal of Clinical Investigation* 5 (2): 133–37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1149777>.
- Runge-Morris, M, K Rose, C N Falany, and T A Kocarek. 1998. "Differential Regulation of Individual Sulfotransferase Isoforms by Phenobarbital in Male Rat Liver." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 26 (8). UNITED STATES: 795–801.
- Ryan, D E, L Ramanathan, S Iida, P E Thomas, M Haniu, J E Shively, C S Lieber, and W Levin. 1985. "Characterization of a Major Form of Rat Hepatic Microsomal Cytochrome P-450 Induced by Isoniazid." *The Journal of Biological Chemistry* 260 (10): 6385–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3997827>.
- Sadee, W, D Wang, A C Papp, J K Pinsonneault, R M Smith, R A Moyer, and A D Johnson. 2011. "Pharmacogenomics of the RNA World: Structural RNA Polymorphisms in Drug

- Therapy." *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 89 (3). United States: 355–65. doi:10.1038/clpt.2010.314.
- Safe, Stephen, Syng-Ook Lee, and Un-Ho Jin. 2013. "Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor in Carcinogenesis and Potential as a Drug Target." *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology* 135 (1). United States: 1–16. doi:10.1093/toxsci/kft128.
- Saiyed, Habibullah, Aruna Dewan, Vijay Bhatnagar, Udyavar Shenoy, Rathika Shenoy, Hirehall Rajmohan, Kumud Patel, et al. 2003. "Effect of Endosulfan on Male Reproductive Development." *Environmental Health Perspectives* 111 (16): 1958–62. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1241773&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Sakaguchi, M, K Mihara, and R Sato. 1984. "Signal Recognition Particle Is Required for Co-Translational Insertion of Cytochrome P-450 into Microsomal Membranes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (11). UNITED STATES: 3361–64.
- Sakaguchi, M, R Tomiyoshi, T Kuroiwa, K Mihara, and T Omura. 1992. "Functions of Signal and Signal-Anchor Sequences Are Determined by the Balance between the Hydrophobic Segment and the N-Terminal Charge." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (1). UNITED STATES: 16–19.
- Sangar, Michelle Cook, Hindupur K Anandatheerthavarada, Weigang Tang, Subbuswamy K Prabu, Martha V Martin, Miroslav Dostalek, F Peter Guengerich, and Narayan G Avadhani. 2009. "Human Liver Mitochondrial Cytochrome P450 2D6--Individual Variations and Implications in Drug Metabolism." *The FEBS Journal* 276 (13): 3440–53. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07067.x.
- Santisteban, I, S Povey, E A Shephard, and I R Phillips. 1988. "The Major Phenobarbital-Inducible Cytochrome P-450 Gene Subfamily (P450IIB) Mapped to the Long Arm of Human Chromosome 19." *Annals of Human Genetics* 52 (Pt 2): 129–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3248006>.
- Sasse, D, and I P Maly. 1991. "Studies on the Periportal Hepatotoxicity of Allyl Alcohol." *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 23 (1-4): 146–49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1947136>.
- Sato, T, M Sakaguchi, K Mihara, and T Omura. 1990. "The Amino-Terminal Structures That Determine Topological Orientation of Cytochrome P-450 in Microsomal Membrane." *The EMBO Journal* 9 (8). ENGLAND: 2391–97.
- Saussele, T, O Burk, J K Blievernicht, K Klein, a Nussler, N Nussler, J G Hengstler, M Eichelbaum, M Schwab, and U M Zanger. 2007. "Selective Induction of Human Hepatic Cytochromes P450 2B6 and 3A4 by Metamizole." *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 82 (3): 265–74. doi:10.1038/sj.clpt.6100138.

- Savary, Camille C, Rozenn Jossé, Arnaud Bruyère, Fabrice Guillet, Marie-Anne Robin, and André Guillouzo. 2014. "Interactions of Endosulfan and Methoxychlor Involving CYP3A4 and CYP2B6 in Human HepaRG Cells." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 42 (8): 1235–40. doi:10.1124/dmd.114.057786.
- Schaap, Mirjam M, Paul F K Wackers, Edwin P Zwart, Ilse Huijskens, Martijs J Jonker, Giel Hendriks, Timo M Breit, Harry van Steeg, Bob van de Water, and Mirjam Luijten. 2014. "A Novel Toxicogenomics-Based Approach to Categorize (non-)genotoxic Carcinogens." *Archives of Toxicology*, October. doi:10.1007/s00204-014-1368-6.
- Schauer, Ute M D, Wolfgang Völkel, and Wolfgang Dekant. 2006. "Toxicokinetics of Tetrabromobisphenol a in Humans and Rats after Oral Administration." *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 91 (1): 49–58. doi:10.1093/toxsci/kfj132.
- Schenkman, J B, and I Jansson. 1999. "Interactions between Cytochrome P450 and Cytochrome b5." *Drug Metabolism Reviews* 31 (2). UNITED STATES: 351–64. doi:10.1081/DMR-100101923.
- Schuetz, Erin G. 2004. "Lessons from the CYP3A4 Promoter." *Molecular Pharmacology* 65 (2): 279–81. doi:10.1124/mol.65.2.279.
- Schuler, Maik, B. Bhaskar Gollapudi, Véronique Thybaud, and James H. Kim. 2011. "Need and Potential Value of the Pig-Ain Vivo Mutation Assay-A Hesi Perspective." *Environmental and Molecular Mutagenesis* 52: 685–89. doi:10.1002/em.20687.
- Schwarz, D, P Kisselev, I Cascorbi, W H Schunck, and I Roots. 2001. "Differential Metabolism of Benzo[a]pyrene and Benzo[a]pyrene-7,8-Dihydrodiol by Human CYP1A1 Variants." *Carcinogenesis* 22 (3): 453–59. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238186>.
- Schwarz, Dieter, Pyotr Kisselev, Spencer S Ericksen, Grazyna D Szklarz, Alexey Chernogolov, Horst Honeck, Wolf-Hagen Schunck, and Ivar Roots. 2004. "Arachidonic and Eicosapentaenoic Acid Metabolism by Human CYP1A1: Highly Stereoselective Formation of 17(R),18(S)-Epoxyeicosatetraenoic Acid." *Biochemical Pharmacology* 67 (8): 1445–57. doi:10.1016/j.bcp.2003.12.023.
- Seliskar, Matej, and Damjana Rozman. 2007. "Mammalian Cytochromes P450--Importance of Tissue Specificity." *Biochimica et Biophysica Acta* 1770 (3): 458–66. doi:10.1016/j.bbagen.2006.09.016.
- Senafi, S B, D J Clarke, and B Burchell. 1994. "Investigation of the Substrate Specificity of a Cloned Expressed Human Bilirubin UDP-Glucuronosyltransferase: UDP-Sugar Specificity and Involvement in Steroid and Xenobiotic Glucuronidation." *The Biochemical Journal* 303 (Pt 1 (October): 233–40. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1137581&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Senekeo-Effenberger, Kathy, Shujuan Chen, Erin Brace-Sinnokrak, Jessica A Bonzo, Mei-Fei Yueh, Upendra Argikar, Jenny Kaeding, et al. 2007. "Expression of the Human UGT1 Locus in Transgenic Mice by 4-Chloro-6-(2,3-Xylidino)-2-Pyrimidinylthioacetic Acid (WY-14643) and Implications on Drug Metabolism through Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Activation." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 35 (3): 419–27. doi:10.1124/dmd.106.013243.
- Shen, Chong, Hongzi Zhang, Guoliang Zhang, and Qin Meng. 2006. "Isoniazid-Induced Hepatotoxicity in Rat Hepatocytes of Gel Entrapment Culture." *Toxicology Letters* 167 (1): 66–74. doi:10.1016/j.toxlet.2006.08.010.
- Shen, Lanlan, Yutaka Kondo, Yi Guo, Jiexin Zhang, Li Zhang, Saira Ahmed, Jingmin Shu, Xinli Chen, Robert A. Waterland, and Jean Pierre J Issa. 2007. "Genome-Wide Profiling of DNA Methylation Reveals a Class of Normally Methylated CpG Island Promoters." *PLoS Genetics* 3: 2023–26. doi:10.1371/journal.pgen.0030181.
- Shertzer, H G, D W Nebert, A Puga, M Ary, D Sonntag, K Dixon, L J Robinson, E Cianciolo, and T P Dalton. 1998. "Dioxin Causes a Sustained Oxidative Stress Response in the Mouse." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 253: 44–48. doi:10.1006/bbrc.1998.9753.
- Shimada, Tsutomu, and Yoshiaki Fujii-Kuriyama. 2004. "Metabolic Activation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to Carcinogens by Cytochromes P450 1A1 and 1B1." *Cancer Science* 95 (1): 1–6. doi:10.1111/j.1349-7006.2004.tb03162.x.
- Shou, M, K R Korzekwa, C L Crespi, F J Gonzalez, and H V Gelboin. 1994. "The Role of 12 cDNA-Expressed Human, Rodent, and Rabbit Cytochromes P450 in the Metabolism of Benzo[a]pyrene and Benzo[a]pyrene Trans-7,8-Dihydrodiol." *Molecular Carcinogenesis* 10 (3): 159–68. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8043197>.
- Shou, M, K W Krausz, F J Gonzalez, and H V Gelboin. 1996. "Metabolic Activation of the Potent Carcinogen Dibenzo[a,l]pyrene by Human Recombinant Cytochromes P450, Lung and Liver Microsomes." *Carcinogenesis* 17 (11): 2429–33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8968059>.
- Shou, M, T Lu, K W Krausz, Y Sai, T Yang, K R Korzekwa, F J Gonzalez, and H V Gelboin. 2000. "Use of Inhibitory Monoclonal Antibodies to Assess the Contribution of Cytochromes P450 to Human Drug Metabolism." *European Journal of Pharmacology* 394 (2-3): 199–209. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10771285>.
- Shukla, Upasana, Nithin Tumma, Theresa Gratsch, Alan Dombkowski, and Raymond F Novak. 2013. "Special Section on Epigenetic Regulation of Drug Metabolizing Enzymes and Transporters Insights into Insulin-Mediated Regulation of CYP2E1: miR-132 / -122 Targeting of CYP2E1 and Role of Phosphatidylinositol 3-Kinase, Akt (Protein Kinase B), Mammalian," no. October: 1769–77.

- Sinclair, J, E Jeffery, S Wrighton, V Kostrubsky, J Szakacs, S Wood, and P Sinclair. 1998. "Alcohol-Mediated Increases in Acetaminophen Hepatotoxicity: Role of CYP2E and CYP3A." *Biochemical Pharmacology* 55 (10): 1557–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9633991>.
- Singer, I I, D W Kawka, S Scott, J R Weidner, R A Mumford, T E Riehl, and W F Stenson. 1996. "Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase and Nitrotyrosine in Colonic Epithelium in Inflammatory Bowel Disease." *Gastroenterology* 111: 871–85.
- Slaviero, Kellie A, Stephen J Clarke, and Laurent P Rivory. 2003. "Inflammatory Response: An Unrecognised Source of Variability in the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cancer Chemotherapy." *The Lancet. Oncology* 4 (4). England: 224–32.
- Smart, D J, K P Ahmedi, J S Harvey, and a M Lynch. 2011. "Genotoxicity Screening via the γ H2AX by Flow Assay." *Mutation Research* 715 (1-2). Elsevier B.V.: 25–31. doi:10.1016/j.mrfmmm.2011.07.001.
- Sobti, R C, A Krishan, and J Davies. 1983. "Cytokinetic and Cytogenetic Effect of Agricultural Chemicals on Human Lymphoid Cells in Vitro. II. Organochlorine Pesticides." *Archives of Toxicology* 52 (3): 221–31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6860144>.
- Song, B J. 1996. "Ethanol-Inducible Cytochrome P450 (CYP2E1): Biochemistry, Molecular Biology and Clinical Relevance: 1996 Update." *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 20 (8 Suppl): 138A – 146A. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8947253>.
- Squires, E James, Tatsuya Sueyoshi, and Masahiko Negishi. 2004. "Cytoplasmic Localization of Pregnane X Receptor and Ligand-Dependent Nuclear Translocation in Mouse Liver." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (47). United States: 49307–14. doi:10.1074/jbc.M407281200.
- Sriraksa, R, C Zeller, M A El-Bahrawy, W Dai, J Daduang, P Jearanaikoon, S Chau-In, R Brown, and T Limpiboon. 2011. "CpG-Island Methylation Study of Liver Fluke-Related Cholangiocarcinoma." *British Journal of Cancer* 104 (8): 1313–18. doi:10.1038/bjc.2011.102.
- Starkov, Anatoly A, Gary Fiskum, Christos Chinopoulos, Beverly J Lorenzo, Susan E Browne, Mulchand S Patel, and M Flint Beal. 2004. "Mitochondrial Alpha-Ketoglutarate Dehydrogenase Complex Generates Reactive Oxygen Species." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24: 7779–88. doi:10.1523/JNEUROSCI.1899-04.2004.
- Starkov, Anatoly A. 2008. "The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Metabolism and Signaling." In *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147:37–52. doi:10.1196/annals.1427.015.

- Stevens, Jeffrey C. 2006. "New Perspectives on the Impact of Cytochrome P450 3A Expression for Pediatric Pharmacology." *Drug Discovery Today* 11 (9-10). England: 440–45. doi:10.1016/j.drudis.2006.03.002.
- Stevens, Jeffrey C, Sandra A Marsh, Matthew J Zaya, Karen J Regina, Karthika Divakaran, Min Le, and Ronald N Hines. 2008. "Developmental Changes in Human Liver CYP2D6 Expression." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 36 (8). United States: 1587–93. doi:10.1124/dmd.108.021873.
- Stocker, K J, W R Howard, J Statham, and R J Proudlock. 1996. "Assessment of the Potential in Vivo Genotoxicity of Fluoranthene." *Mutagenesis* 11 (5): 493–96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8921511>.
- Stone, Andrew N, Peter I Mackenzie, Aleksandra Galetin, J Brian Houston, and John O Miners. 2003. "Isoform Selectivity and Kinetics of Morphine 3- and 6-Glucuronidation by Human Udp-Glucuronosyltransferases: Evidence for Atypical Glucuronidation Kinetics by UGT2B7." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 31 (9): 1086–89. doi:10.1124/dmd.31.9.1086.
- Strassburg, C P, S Kneip, J Topp, P Obermayer-Straub, A Barut, R H Tukey, and M P Manns. 2000. "Polymorphic Gene Regulation and Interindividual Variation of UDP-Glucuronosyltransferase Activity in Human Small Intestine." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (46): 36164–71. doi:10.1074/jbc.M002180200.
- Stroynowska-Czerwinska, Anna, Agnieszka Fiszer, and Wlodzimierz J Krzyzosiak. 2014. "The Panorama of miRNA-Mediated Mechanisms in Mammalian Cells." *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 71 (12): 2253–70. doi:10.1007/s00018-013-1551-6.
- Sueyoshi, T, T Kawamoto, I Zelko, P Honkakoski, and M Negishi. 1999a. "The Repressed Nuclear Receptor CAR Responds to Phenobarbital in Activating the Human CYP2B6 Gene." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (10). UNITED STATES: 6043–46.
- . 1999b. "The Repressed Nuclear Receptor CAR Responds to Phenobarbital in Activating the Human CYP2B6 Gene." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (10): 6043–46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10037683>.
- Sugatani, J, H Kojima, A Ueda, S Kakizaki, K Yoshinari, Q H Gong, I S Owens, M Negishi, and T Sueyoshi. 2001. "The Phenobarbital Response Enhancer Module in the Human Bilirubin UDP-Glucuronosyltransferase UGT1A1 Gene and Regulation by the Nuclear Receptor CAR." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 33 (5). United States: 1232–38. doi:10.1053/jhep.2001.24172.
- Sugatani, Junko, Shinichi Nishitani, Kasumi Yamakawa, Kouichi Yoshinari, Tatsuya Sueyoshi, Masahiko Negishi, and Masao Miwa. 2005. "Transcriptional Regulation of Human UGT1A1 Gene Expression: Activated Glucocorticoid Receptor Enhances Constitutive Androstane Receptor/pregnane X Receptor-Mediated UDP-Glucuronosyltransferase

- 1A1 Regulation with Glucocorticoid Receptor-Interacting Protei." *Molecular Pharmacology* 67 (3): 845–55. doi:10.1124/mol.104.007161.
- Swales, Karen, and Masahiko Negishi. 2004. "CAR, Driving into the Future." *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 18 (7). United States: 1589–98. doi:10.1210/me.2003-0397.
- Szczesna-Skorupa, E, C D Chen, and B Kemper. 2000. "Cytochromes P450 2C1/2 and P450 2E1 Are Retained in the Endoplasmic Reticulum Membrane by Different Mechanisms." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 374 (2). UNITED STATES: 128–36. doi:10.1006/abbi.1999.1628.
- Takagi, Shingo, Miki Nakajima, Takuya Mohri, and Tsuyoshi Yokoi. 2008. "Post-Transcriptional Regulation of Human Pregnane X Receptor by Micro-RNA Affects the Expression of Cytochrome P450 3A4." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (15). United States: 9674–80. doi:10.1074/jbc.M709382200.
- Takeshita, Akira, Manabu Taguchi, Noriyuki Koibuchi, and Yasunori Ozawa. 2002. "Putative Role of the Orphan Nuclear Receptor SXR (steroid and Xenobiotic Receptor) in the Mechanism of CYP3A4 Inhibition by Xenobiotics." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (36). United States: 32453–58. doi:10.1074/jbc.M111245200.
- Tan, Zongqing, Mingya Huang, Alvaro Puga, and Ying Xia. 2004. "A Critical Role for MAP Kinases in the Control of Ah Receptor Complex Activity." *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology* 82 (1): 80–87. doi:10.1093/toxsci/kfh228.
- Tang, J, Y Cao, R L Rose, A A Brimfield, D Dai, J A Goldstein, and E Hodgson. 2001. "Metabolism of Chlorpyrifos by Human Cytochrome P450 Isoforms and Human, Mouse, and Rat Liver Microsomes." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 29 (9): 1201–4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11502728>.
- Tarantini, Adeline, Anne Maître, Emmanuel Lefèbvre, Marie Marques, Afef Rajhi, and Thierry Douki. 2011. "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Binary Mixtures Modulate the Efficiency of Benzo[a]pyrene to Form DNA Adducts in Human Cells." *Toxicology* 279 (1-3). Elsevier Ireland Ltd: 36–44. doi:10.1016/j.tox.2010.09.002.
- Tassaneeyakul, W, M E Veronese, D J Birkett, and J O Miners. 1993. "High-Performance Liquid Chromatographic Assay for 4-Nitrophenol Hydroxylation, a Putative Cytochrome P-4502E1 Activity, in Human Liver Microsomes." *Journal of Chromatography* 616 (1): 73–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8376495>.
- Tateno, C, S Ito, M Tanaka, M Oyamada, and A Yoshitake. 1994. "Effect of DDT on Hepatic Gap Junctional Intercellular Communication in Rats." *Carcinogenesis* 15: 517–21.
- Taylor, James I, Philip B Grace, and Sheila A Bingham. 2005. "Optimization of Conditions for the Enzymatic Hydrolysis of Phytoestrogen Conjugates in Urine and Plasma." *Analytical Biochemistry* 341 (2): 220–29. doi:10.1016/j.ab.2005.03.053.

- Thomas, Maria, Oliver Burk, Britta Klumpp, Benjamin A Kandel, Georg Damm, Thomas S Weiss, Kathrin Klein, Matthias Schwab, Ulrich M Zanger, and M T Stuttgart. 2013. "Direct Transcriptional Regulation of Human Hepatic Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) by Peroxisome Proliferator – Activated Receptor Alpha (PPAR a) S."
- Thompson, Laura L, Brent J Guppy, Laryssa Sawchuk, James R Davie, and Kirk J McManus. 2013. "Regulation of Chromatin Structure via Histone Post-Translational Modification and the Link to Carcinogenesis." *Cancer Metastasis Reviews* 32 (3-4): 363–76. doi:10.1007/s10555-013-9434-8.
- Tirona, Rommel G, Woojin Lee, Brenda F Leake, Lu-Bin Lan, Cynthia Brimer Cline, Vishal Lamba, Fereshteh Parviz, et al. 2003. "The Orphan Nuclear Receptor HNF4alpha Determines PXR- and CAR-Mediated Xenobiotic Induction of CYP3A4." *Nature Medicine* 9 (2): 220–24. doi:10.1038/nm815.
- Tishkoff, Sarah A, Floyd A Reed, Françoise R Friedlaender, Christopher Ehret, Alessia Ranciaro, Alain Froment, Jibril B Hirbo, et al. 2009. "The Genetic Structure and History of Africans and African Americans." *Science (New York, N.Y.)* 324 (5930): 1035–44. doi:10.1126/science.1172257.
- Trosko, J E, and R J Ruch. 1998. "Cell-Cell Communication in Carcinogenesis." *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library* 3: d208–36.
- Truong, Nhu-Traï, Arlette Moncion, Robert Barouki, Philippe Beaune, and Isabelle de Waziers. 2005. "Regulatory Sequence Responsible for Insulin Destabilization of Cytochrome P450 2B1 (CYP2B1) mRNA." *The Biochemical Journal* 388 (Pt 1): 227–35. doi:10.1042/BJ20041510.
- Turpeinen, Miia, Ari Tolonen, Christophe Chesne, André Guillouzo, Jouko Uusitalo, and Olavi Pelkonen. 2009. "Functional Expression, Inhibition and Induction of CYP Enzymes in HepaRG Cells." *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA* 23 (4): 748–53. doi:10.1016/j.tiv.2009.03.008.
- Ubeaudi, Genevieve, Claus-ditter Schiller I, Daniel Jaeck, and Philippe Coassoloi. 2001. "Comparison of the Stability of Some Major Cytochrome P450 and Conjugation Reactions in Rat , Dog and Human Hepatocyte Monolayers" 26 (1): 37–45.
- Ueda, Rika, Hiromi Iketaki, Kiyoshi Nagata, Shioko Kimura, Frank J Gonzalez, Kazutomi Kusano, Tsutomu Yoshimura, and Yasushi Yamazoe. 2006. "A Common Regulatory Region Functions Bidirectionally in Transcriptional Activation of the Human CYP1A1 and CYP1A2 Genes." *Molecular Pharmacology* 69 (6): 1924–30. doi:10.1124/mol.105.021220.
- Uhl, M, C Helma, and S Knasmüller. 1999. "Single-Cell Gel Electrophoresis Assays with Human-Derived Hepatoma (Hep G2) Cells." *Mutation Research* 441 (2): 215–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10333535>.

- Ulutaş, Onur Kenan, Nurçin Yildiz, Emre Durmaz, Müfide Aydoğan Ahabab, Nurhayat Barlas, and İsmet Çok. 2011. "An in Vivo Assessment of the Genotoxic Potential of Bisphenol A and 4-Tert-Octylphenol in Rats." *Archives of Toxicology* 85 (8): 995–1001. doi:10.1007/s00204-010-0620-y.
- Umeno, M, B J Song, C Kozak, H V Gelboin, and F J Gonzalez. 1988. "The Rat P450IIE1 Gene: Complete Intron and Exon Sequence, Chromosome Mapping, and Correlation of Developmental Expression with Specific 5' Cytosine Demethylation." *The Journal of Biological Chemistry* 263 (10): 4956–62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2832413>.
- Upham, B L, L M Weis, and J E Trosko. 1998. "Modulated Gap Junctional Intercellular Communication as a Biomarker of PAH Epigenetic Toxicity: Structure-Function Relationship." *Environmental Health Perspectives* 106 Suppl (August): 975–81. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1533337&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Valavanidis, Athanasios, Thomais Vlachogianni, and Constantinos Fiotakis. 2009. "8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis." *Journal of Environmental Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews* 27: 120–39. doi:10.1080/10590500902885684.
- Valentin-Severin, Isabelle, Ludovic Le Hégarat, Jean-Claude Lhuguenot, Anne-Marie Le Bon, and Marie-Christine Chagnon. 2003. "Use of HepG2 Cell Line for Direct or Indirect Mutagens Screening: Comparative Investigation between Comet and Micronucleus Assays." *Mutation Research* 536 (1-2): 79–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12694748>.
- Vandenberg, Laura N, Russ Hauser, Michele Marcus, Nicolas Olea, and Wade V Welshons. "Human Exposure to Bisphenol A (BPA)." *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)* 24 (2): 139–77. doi:10.1016/j.reprotox.2007.07.010.
- Verreault, Mélanie, Kathy Senekeo-Effenberger, Jocelyn Trottier, Jessica A Bonzo, Julie Bélanger, Jenny Kaeding, Bart Staels, Patrick Caron, Robert H Tukey, and Olivier Barbier. 2006. "The Liver X-Receptor Alpha Controls Hepatic Expression of the Human Bile Acid-Glucuronidating UGT1A3 Enzyme in Human Cells and Transgenic Mice." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 44 (2): 368–78. doi:10.1002/hep.21259.
- Vickers, Alison E M, and Robyn L Fisher. 2004. "Organ Slices for the Evaluation of Human Drug Toxicity." *Chemico-Biological Interactions* 150 (1): 87–96. doi:10.1016/j.cbi.2004.09.005.
- Vickers, Alison E M, Robyn Fisher, Peter Olinga, and Sharon Dial. 2011. "Repair Pathways Evident in Human Liver Organ Slices." *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 25 (7): 1485–92. doi:10.1016/j.tiv.2011.04.029.

- Wahli, W. 2008. "A Gut Feeling of the PXR, PPAR and NF- κ B Connection." In *Journal of Internal Medicine*, 263:613–19. doi:10.1111/j.1365-2796.2008.01951.x.
- Wang, D, Y Guo, S A Wrighton, G E Cooke, and W Sadee. 2011. "Intronic Polymorphism in CYP3A4 Affects Hepatic Expression and Response to Statin Drugs." *The Pharmacogenomics Journal* 11 (4): 274–86. doi:10.1038/tj.2010.28.
- Wang, Jue, Yin Hu, Jana Nekvindova, Magnus Ingelman-Sundberg, and Etienne P a Neve. 2010. "IL-4-Mediated Transcriptional Regulation of Human CYP2E1 by Two Independent Signaling Pathways." *Biochemical Pharmacology* 80 (10). Elsevier Inc.: 1592–1600. doi:10.1016/j.bcp.2010.08.005.
- Watanabe, J, S Hayashi, and K Kawajiri. 1994. "Different Regulation and Expression of the Human CYP2E1 Gene due to the RsaI Polymorphism in the 5'-Flanking Region." *Journal of Biochemistry* 116 (2): 321–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7529759>.
- Watters, Gary Peter, Daniel James Smart, James Stephen Harvey, and Caroline Ann Austin. 2009. "H2AX Phosphorylation as a Genotoxicity Endpoint." *Mutation Research* 679 (1-2): 50–58. doi:10.1016/j.mrgentox.2009.07.007.
- Waxman, David J, and Minita G Holloway. 2009. "Sex Differences in the Expression of Hepatic Drug Metabolizing Enzymes." *Molecular Pharmacology* 76 (2). United States: 215–28. doi:10.1124/mol.109.056705.
- Weis, L M, A M Rummel, S J Masten, J E Trosko, and B L Upham. 1998. "Bay or Baylike Regions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Were Potent Inhibitors of Gap Junctional Intercellular Communication." *Environmental Health Perspectives* 106 (1): 17–22. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1532939&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Westerink, Walter M a, and Willem G E J Schoonen. 2007a. "Phase II Enzyme Levels in HepG2 Cells and Cryopreserved Primary Human Hepatocytes and Their Induction in HepG2 Cells." *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA* 21 (8): 1592–1602. doi:10.1016/j.tiv.2007.06.017.
- . 2007b. "Cytochrome P450 Enzyme Levels in HepG2 Cells and Cryopreserved Primary Human Hepatocytes and Their Induction in HepG2 Cells." *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA* 21 (8): 1581–91. doi:10.1016/j.tiv.2007.05.014.
- Westerink, Walter M a, Joe C R Stevenson, G Jean Horbach, and Willem G E J Schoonen. 2010. "The Development of RAD51C, Cystatin A, p53 and Nrf2 Luciferase-Reporter Assays in Metabolically Competent HepG2 Cells for the Assessment of Mechanism-Based Genotoxicity and of Oxidative Stress in the Early Research Phase of Drug Development." *Mutation Research* 696 (1): 21–40. doi:10.1016/j.mrgentox.2009.12.007.

- Westerink, Walter M a, Joe C R Stevenson, Annick Lauwers, Gerard Griffioen, G Jean Horbach, and Willem G E J Schoonen. 2009. "Evaluation of the Vitotox and RadarScreen Assays for the Rapid Assessment of Genotoxicity in the Early Research Phase of Drug Development." *Mutation Research* 676 (1-2): 113–30. doi:10.1016/j.mrgentox.2009.04.008.
- Wild, Christopher P, and Ruggero Montesano. 2009. "A Model of Interaction: Aflatoxins and Hepatitis Viruses in Liver Cancer Aetiology and Prevention." *Cancer Letters* 286 (1): 22–28. doi:10.1016/j.canlet.2009.02.053.
- Winters, D K, and A I Cederbaum. 1992. "Time Course Characterization of the Induction of Cytochrome P-450 2E1 by Pyrazole and 4-Methylpyrazole." *Biochimica et Biophysica Acta* 1117 (1): 15–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1627587>.
- Wolf, and Niels Peter Luepke. 1997. "Formation of Micronuclei in Incubated Hen's Eggs as a Measure of Genotoxicity." *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 394: 163–75. doi:10.1016/S1383-5718(97)00136-8.
- Woodcroft, Kimberley J, Mikehl S Hafner, and Raymond F Novak. 2002. "Insulin Signaling in the Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of CYP2E1 Expression." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 35 (2): 263–73. doi:10.1053/jhep.2002.30691.
- Wozniak, Ann L, Nataliya N Bulayeva, and Cheryl S Watson. 2005. "Xenoestrogens at Picomolar to Nanomolar Concentrations Trigger Membrane Estrogen Receptor-Alpha-Mediated Ca²⁺ Fluxes and Prolactin Release in GH3/B6 Pituitary Tumor Cells." *Environmental Health Perspectives* 113 (4): 431–39. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1278483&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Wrighton, S A, P E Thomas, D T Molowa, M Haniu, J E Shively, S L Maines, P B Watkins, G Parker, G Mendez-Picon, and W Levin. 1986. "Characterization of Ethanol-Inducible Human Liver N-Nitrosodimethylamine Demethylase." *Biochemistry* 25 (22): 6731–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3801389>.
- Xiao, Yongtao, Jun Wang, Weihui Yan, Ying Zhou, Yingwei Chen, Kejun Zhou, Jie Wen, Yang Wang, and Wei Cai. 2014. "Dysregulated miR-124 and miR-200 Expression Contribute to Cholangiocyte Proliferation in the Cholestatic Liver by Targeting IL-6/STAT3 Signalling." *Journal of Hepatology*, October. doi:10.1016/j.jhep.2014.10.033.
- Yamazaki, H, Y Inui, S A Wrighton, F P Guengerich, and T Shimada. 1995. "Procarcinogen Activation by Cytochrome P450 3A4 and 3A5 Expressed in Escherichia Coli and by Human Liver Microsomes." *Carcinogenesis* 16 (9): 2167–70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7554070>.
- Yamazaki, H, M Nakano, E M Gillam, L C Bell, F P Guengerich, and T Shimada. 1996. "Requirements for Cytochrome b5 in the Oxidation of 7-Ethoxycoumarin, Chlorzoxazone, Aniline, and N-Nitrosodimethylamine by Recombinant Cytochrome

- P450 2E1 and by Human Liver Microsomes." *Biochemical Pharmacology* 52 (2): 301–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8694855>.
- Yang, Hui, Brandy Garzel, Scott Heyward, Timothy Moeller, Paul Shapiro, and Hongbing Wang. 2014. "Metformin Represses Drug-Induced Expression of CYP2B6 by Modulating the Constitutive Androstane Receptor Signaling." *Molecular Pharmacology* 85 (2): 249–60. doi:10.1124/mol.113.089763.
- Yang, Xia, Bin Zhang, Cliona Molony, Eugene Chudin, Ke Hao, Jun Zhu, Andrea Gaedigk, et al. 2010. "Systematic Genetic and Genomic Analysis of Cytochrome P450 Enzyme Activities in Human Liver." *Genome Research* 20 (8). United States: 1020–36. doi:10.1101/gr.103341.109.
- Yoshida, Y, N Kimura, H Oda, and A Kakinuma. 1996. "Insulin Suppresses the Induction of CYP2B1 and CYP2B2 Gene Expression by Phenobarbital in Adult Rat Cultured Hepatocytes." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 229 (1): 182–88. doi:10.1006/bbrc.1996.1777.
- Yue, Jiang, Guicheng Dong, Chunyan He, Jie Chen, Yinghui Liu, and Renxiu Peng. 2009. "Protective Effects of Thiopronin against Isoniazid-Induced Hepatotoxicity in Rats." *Toxicology* 264 (3): 185–91. doi:10.1016/j.tox.2009.08.006.
- Zacharewski, T R, M D Meek, J H Clemons, Z F Wu, M R Fielden, and J B Matthews. 1998. "Examination of the in Vitro and in Vivo Estrogenic Activities of Eight Commercial Phthalate Esters." *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology* 46 (2): 282–93. doi:10.1006/toxs.1998.2505.
- Zangar, R C, and R F Novak. 1997. "Effects of Fatty Acids and Ketone Bodies on Cytochromes P450 2B, 4A, and 2E1 Expression in Primary Cultured Rat Hepatocytes." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 337 (2): 217–24. doi:10.1006/abbi.1996.9785.
- Zerilli, A, D Ratanasavanh, D Lucas, T Goasduff, Y Dréano, C Menard, D Picart, and F Berthou. 1997. "Both Cytochromes P450 2E1 and 3A Are Involved in the O-Hydroxylation of P-Nitrophenol, a Catalytic Activity Known to Be Specific for P450 2E1." *Chemical Research in Toxicology* 10 (10): 1205–12. doi:10.1021/tx970048z.
- Zhang, J D, N Berntsen, a Roth, and M Ebeling. 2014. "Data Mining Reveals a Network of Early-Response Genes as a Consensus Signature of Drug-Induced in Vitro and in Vivo Toxicity." *The Pharmacogenomics Journal* 14: 208–16. doi:10.1038/tpj.2013.39.
- Zhang, Jun, Yijuan Wei, Bingfang Hu, Min Huang, Wen Xie, and Yonggong Zhai. 2013. "Activation of Human Stearoyl-Coenzyme A Desaturase 1 Contributes to the Lipogenic Effect of PXR in HepG2 Cells." *PloS One* 8 (7). United States: e67959. doi:10.1371/journal.pone.0067959.

- Zhang, Q Y, D Dunbar, and L Kaminsky. 2000. "Human Cytochrome P-450 Metabolism of Retinals to Retinoic Acids." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 28 (3): 292–97. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10681373>.
- Zhang, Xiaowei, Richard M K Yu, Paul D Jones, Gabriel K W Lam, John L Newsted, Tannia Gracia, Markus Hecker, et al. 2005. "Quantitative RT-PCR Methods for Evaluating Toxicant-Induced Effects on Steroidogenesis Using the H295R Cell Line." *Environmental Science & Technology* 39 (8): 2777–85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15884376>.
- Zhang, Yijing, Kathrin Klein, Aarathi Sugathan, Najlla Nassery, Alan Dombkowski, Ulrich M Zanger, and David J Waxman. 2011. "Transcriptional Profiling of Human Liver Identifies Sex-Biased Genes Associated with Polygenic Dyslipidemia and Coronary Artery Disease." *PloS One* 6 (8). United States: e23506. doi:10.1371/journal.pone.0023506.
- Zhang, Z Y, M J Fasco, L Huang, F P Guengerich, and L S Kaminsky. 1996. "Characterization of Purified Human Recombinant Cytochrome P4501A1-Ile462 and -Val462: Assessment of a Role for the Rare Allele in Carcinogenesis." *Cancer Research* 56 (17): 3926–33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8752159>.
- Zhou, Jie, Maria Febbraio, Taira Wada, Yonggong Zhai, Ramalinga Kuruba, Jinhan He, Jung Hoon Lee, et al. 2008. "Hepatic Fatty Acid Transporter Cd36 Is a Common Target of LXR, PXR, and PPAR?? In Promoting Steatosis." *Gastroenterology* 134. doi:10.1053/j.gastro.2007.11.037.
- Zhu, B T, and A H Conney. 1998. "Functional Role of Estrogen Metabolism in Target Cells: Review and Perspectives." *Carcinogenesis* 19 (1): 1–27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9472688>.
- Zhu, Bao Ting. 2002. "Catechol-O-Methyltransferase (COMT)-Mediated Methylation Metabolism of Endogenous Bioactive Catechols and Modulation by Endobiotics and Xenobiotics: Importance in Pathophysiology and Pathogenesis." *Current Drug Metabolism* 3 (3): 321–49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12083324>.
- Zhu, Liang, Huarong Chen, Donger Zhou, Dan Li, Rui Bai, Shu Zheng, and Weiting Ge. 2012. "MicroRNA-9 up-Regulation Is Involved in Colorectal Cancer Metastasis via Promoting Cell Motility." *Medical Oncology (Northwood, London, England)* 29 (2): 1037–43. doi:10.1007/s12032-011-9975-z.
- Zhukov, A, and M Ingelman-Sundberg. 1999. "Relationship between Cytochrome P450 Catalytic Cycling and Stability: Fast Degradation of Ethanol-Inducible Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in Hepatoma Cells Is Abolished by Inactivation of Its Electron Donor NADPH-Cytochrome P450 Reductase." *The Biochemical Journal* 340 (Pt 2 (June): 453–58. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1220271&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Résumé

Human exposure to toxic chemicals is virtually unavoidable due to contamination of air, water and food. A number of environmental contaminants are recognized as mutagenic and/or carcinogenic in animal but they are often only suspected to have similar effects in Humans. The lack of knowledge on the effects of most industrial-made chemicals has led the EU to launch the REACH program with the aim of evaluating the toxicity of more than 30.000 molecules. Such evaluation would require the use of at least 4 millions of animals for an estimated cost of 2.8 billions €. While the relevance of these *in vivo* models remains controversial.

In vitro, methods are considered as potential alternatives to animal experimentation. However, regarding cell models their choice and experimental conditions remain an open question. Primary human hepatocytes are recognized as the most pertinent model for toxicity studies but their use is usually limited to a few days. Hepatic cell lines and specially HepaRG cells could represent an alternative. These cells possess the indefinite growth capacity of hepatic cell lines and express metabolizing enzymes close to those measured in primary human hepatocytes. In addition, the xenobiotic metabolizing activities remain stable over a long period of times which allows the evaluation of chronic exposure to contaminants, a key issue particularly in genotoxicity. However, there is still a need to better characterize this cell line and to develop new toxicity assays.

In this work, we first developed a high-throughput assay using the *in situ* quantification of γ H2AX in order to evaluate the acute and chronic genotoxicity of low doses of environmental contaminants. This test was successfully validated by the evaluation of 10 pollutants following a 1, 7 or 14 days exposure.

Then, we generated biosensor cell lines derived from HepaRG, which are able to detect transcriptional alteration of the major metabolizing enzymes induced by pollutants. By transient transfection, we first validated our constructs containing the reporter gene luciferase under control of some of the major XMEs promoters using prototypical inducers and 10 environmental contaminants. Then, we generated stable cell lines expressing GFP as a reporter gene, which provides a fast assay to detect the induction capacity of xenobiotics on XMEs.

Among the XMEs, CYP2E1 is an enzyme of significant importance for human health. This CYP, induced in some physiopathological conditions such as diabetes and obesity, is involved in pro-carcinogen activations and ROS production. HepaRG could be an interesting model for CYP2E1 studying but its expression and activity in these cells remains unclear. Our goal was to characterize the CYP2E1 expression and activity in this model. Using the chlorzoxazone, a specific marker of the CYP2E1 activity, we were able to show the *in vitro* impact of phase II metabolizing enzyme on the apparent CYP2E1 activity. We provide here some recommendations in order to properly assess the CYP2E1 activity in human hepatocytes and HepaRG cells.

L'exposition humaine aux contaminants environnementaux est inévitable du fait de leur présence dans l'eau, l'air et l'alimentation. La plupart d'entre eux sont reconnus comme étant mutagènes et/ou carcinogènes chez l'animal mais ils sont souvent seulement suspectés de l'être chez l'Homme. Le manque de connaissance vis-à-vis des substances chimiques a conduit l'UE à lancer le programme REACH avec l'objectif d'évaluer la toxicité d'environ 30 000 molécules. Cette évaluation nécessiterait l'utilisation de plus de 4 millions d'animaux et la pertinence controversée de ces modèles pourrait aboutir à des conclusions discutables. Les méthodes *in vitro* sont considérées comme une alternative potentielle à l'expérimentation animale. Néanmoins, le choix du modèle cellulaire et des conditions expérimentales restent à préciser. Les hépatocytes humains en culture primaire représentent le modèle le plus pertinent en toxicologie malgré de nombreuses contraintes (variabilité inter-individuelle, changements phénotypique précoces, obtention aléatoire). La lignée HepaRG constitue une alternative intéressante puisque ces cellules peuvent proliférer de manière illimitée et expriment les EMXs à des niveaux proches des hépatocytes humains. L'expression de ces enzymes restant stable pendant plusieurs semaines, ce modèle permet l'évaluation du risque lié à une exposition chronique aux contaminants environnementaux, essentielle en génotoxicité. Il reste cependant nécessaire de caractériser plus amplement cette lignée vis-à-vis des EMXs et de l'adapter aux tests de toxicologie actuels.

Dans ces travaux, nous avons développé un test haut débit utilisant la quantification *in situ* des histones phosphorylées γ H2AX avec l'objectif de pouvoir évaluer le risque génotoxique d'une exposition unique ou répétée aux contaminants environnementaux. Ce test a été validé avec succès par l'évaluation de la génotoxicité associée à une exposition de 1, 7 et 14 jours pour 10 polluants.

Nous avons ensuite généré des lignées recombinantes biosenseurs, dérivées du modèle HepaRG et permettant d'identifier les xénobiotiques altérant l'expression transcriptionnelle des EMXs. Par transfection transitoire, nous avons dans un premier temps validé à l'aide d'inducteurs prototypiques et de nos 10 contaminants nos constructions contenant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle des promoteurs de plusieurs EMXs. Ensuite, nous avons généré des lignées stables exprimant la GFP comme gène rapporteur et permettant une détection rapide des xénobiotiques capables d'induire l'expression des EMXs.

Parmi les EMXs, le CYP2E1 joue un rôle important en santé humaine. En effet, cette enzyme induite dans certaines conditions physiopathologiques comme le diabète et l'obésité est responsable de l'activation de nombreux pro-carcinogènes et est à l'origine d'une production d'EROs. Les cellules HepaRG pourraient constituer un modèle pertinent pour l'étude du CYP2E1. Cependant, l'expression et l'activité de cette enzyme au sein de ce modèle nécessitent d'être mieux caractérisées en regard des données discordantes de la littérature. A l'aide de la chlorzoxazone, un marqueur spécifique de l'activité du CYP2E1, nous avons démontré l'influence du métabolisme de phase II sur l'activité apparente du CYP2E1. Nous proposons ici quelques recommandations afin de mieux quantifier l'activité du CYP2E1 sur les hépatocytes humains et sur le modèle HepaRG à l'aide la chlorzoxazone.