

# **Etude des effets aigus et chroniques de contaminants de l'environnement sur les cellules de l'hépatome humain HepaRG (HEPACELLTOX)**

André GUILLOUZO (PU) (Coordinateur), Julie DUMONT (Post-doctorante), Rozenn JOSSE (Doctorante), Carine LAMBERT (Post-doctorante), UMR INSERM 620-Université de Rennes 1.

Valérie FESSARD (CR Anses), Ludovic LE HEGARAT (Chargé de projet CDI Anses), Sylvie HUET (TFR N Anses), Rachelle LANCELEUR (Technicienne CDD Anses), Annick MOUROT (TFR E, Anses), Jean-Michel POUL (CR Anses), Anses, Unité de Toxicologie des contaminants, BP 90203, 35133 Fougères.

Christiane GUGUEN-GUILLOUZO (DR INSERM), Denise GLAISE (IE INSERM), UMR INSERM U522-Université de Rennes 1.

Isabelle MOREL, (PU-PH) Service de Toxicologie, CHU de Rennes.

## **1. Introduction**

De nombreux contaminants de l'environnement connus pour être toxiques voire mutagènes/cancérogènes chez l'animal, sont au mieux seulement suspectés de l'être chez l'homme. Cette suspicion repose le plus souvent sur des études épidémiologiques et l'observation d'une plus grande fréquence de cancers associés à une exposition professionnelle à un contaminant particulier ou à certaines habitudes alimentaires. Ce manque de données résulte de l'absence de modèle d'étude pertinent d'expositions chroniques à de faibles doses de contaminants séparément ou en mélange. L'objectif de ce projet était d'évaluer la pertinence d'une nouvelle lignée de cellules hépatiques issues d'un hépatome humain, la lignée HepaRG, pour des études à long terme de cytotoxicité et de génotoxicité des substances chimiques. Ces cellules possèdent à la fois les propriétés fonctionnelles des hépatocytes humains adultes en culture primaire et la capacité de prolifération indéfinie des lignées d'hépatome.

A confluence, les cellules HepaRG, peuvent, en effet, se différencier en hépatocytes et en cellules biliaires, puis lorsqu'elles sont remises en culture, retrouver des caractéristiques de cellules indifférenciées pendant une phase de prolifération active avant de se redifférencier (transdifférenciation) à nouveau en hépatocytes ou en cellules biliaires. Seuls les hépatocytes HepaRG différenciés expriment des taux de cytochromes (CYP) P450 comparables à ceux d'hépatocytes humains en culture primaire (Aninat, et al., DMD, 2006). Il est cependant possible de conserver des cellules HepaRG différenciées après ensemencement si celui-ci est opéré à haute densité.

## 2. Matériel et Méthodes

**Culture des cellules HepaRG :** Les cultures de cellules HepaRG différenciées ont été obtenues selon des conditions expérimentales précédemment décrites (Gripon et al., PNAS, 2002) et traitées soit dans un milieu sans sérum et sans diméthylsulfoxyde soit dans un milieu contenant 10% de sérum et 2% de diméthylsulfoxyde.

**Tests de cytotoxicité :** Contenu en ATP intracellulaire, test MTT, activité de la caspase 3, mesure de l'annexine V et des espèces réactives de l'oxygène.

**Tests de génotoxicité :** Comètes et micronoyau.

**Mesure des activités de cytochromes P450 :** HPLC

**Mesure des ARNm :** Puces à ADN Agilent 4x44K et RT-qPCR

## 3. Résultats

Afin de définir les conditions optimales d'utilisation des cellules HepaRG et valider leur intérêt pour des études de toxicité chronique, la stabilité fonctionnelle de ces cellules, une fois différenciées, a d'abord été analysée sur plusieurs semaines (environ un mois) par la mesure des transcrits de gènes hépato-spécifiques (aldolase B), et de plusieurs gènes impliqués dans les fonctions de métabolisation (CYP3A4, CYP1A2, CYP2E1, CYP2B6, GSTA1/2, mEH, UGT1A1, CAR, PXR, catalase, MnSOD) et de transport (MDR1, MRP2, OCT1, BSEP) des xénobiotiques par RT-qPCR et parallèlement par la détermination de l'activité enzymatique des CYP3A4 et CYP1A2 et de leur réponse à des inducteurs spécifiques (rifampicine, 3-méthylcholanthrène) par HPLC. Des résultats proches de ceux observés dans des cultures primaires d'hépatocytes adultes ont été obtenus (1).

La pertinence des cellules HepaRG pour l'étude des effets toxiques à long terme des xénobiotiques a ensuite été évaluée. Une étape préliminaire a consisté à observer les changements morphologiques et à mesurer la cytotoxicité (test MTT), associés à un traitement des cellules HepaRG différenciées avec de faibles doses d'aflatoxine B1 (AFB1) tous les 2-3 jours pendant deux semaines. Pour quantifier une cytotoxicité plus spécifique de cette mycotoxine sur les hépatocytes HepaRG, l'activité du CYP3A4 en réponse aux traitements a également été mesurée. Un effet cumulatif a été démontré (1).

L'intérêt de la lignée HepaRG pour les tests de génotoxicité a été estimé à partir de deux tests classiquement utilisés *in vitro*: le test des comètes qui permet de détecter les dommages primaires de l'ADN (cassures simple et double brins, sites abasiques...) et le test du micronoyau qui met en évidence des effets clastogènes (pertes de fragments de chromosomes) ou des effets aneugènes (pertes de fragments de chromosomes entiers) générés pendant la division cellulaire. Plusieurs composés, génotoxiques indirects (AFB1, acrylamide, benzo[a]pyrène (B[a]P), cyclophosphamide (CPA), N-diméthylnitrosamine (N-DMA), 2-amino-1-méthyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), 2-amino-3-méthylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) et directs (méthylméthane sulfonate et glycidamide), et nongénotoxique (pyrène) ont été testés sur des cellules HepaRG différenciées. Les effets génotoxiques

de l'AFB1, la CPA et la PhiP ont également été évalués sur des cellules HepaRG non différenciées et des cellules HepG2 avec le test des comètes. Les composés testés présentant les effets génotoxiques les plus significatifs après métabolisation étaient l'AFB1, le BaP, la PhiP et la CPA. Compte tenu des différentes voies métaboliques impliquées dans l'activation de ces composés en métabolites génotoxiques, ces résultats semblaient confirmer que les cellules HepaRG présentaient une activité significative des CYP1A1 (BaP et PhiP), CYP1A2 (AFB1 et PhiP), CYP3A4 (AFB1), et CYP2B6 (CPA). Une absence de réponse a été observée avec l'acrylamide et la N-DMA, suggérant une activité limitée du CYP2E1 dans les cellules HepaRG (2). Les résultats du test des comètes sur les cellules HepaRG différenciées ont été comparés avec ceux obtenus d'une part sur les cellules HepaRG non différenciées et d'autre part sur les cellules HepG2. Alors que les cellules HepaRG différenciées répondaient positivement dans le test des comètes avec l'AFB1, la CPA, le B[a]P et la PhiP, seul le B[a]P provoquait des cassures dans les cellules HepaRG non différenciées et les cellules HepG2, indiquant une meilleure sensibilité et spécificité des cellules HepaRG différenciées vis-à-vis de composés pro-génotoxiques (2). La cylindrospermopsine, une cyanotoxine produite par certaines cyanobactéries, s'est révélée également génotoxique dans des cellules HepaRG différenciées après activation par le CYP3A4 (3)

La toxicité aiguë et chronique de deux des principales amines aromatiques hétérocycliques, PhiP et 2-amino-3,8-diméthylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx), a été analysée à l'aide de l'approche transcriptomique à des concentrations compatibles avec l'exposition humaine. Aucune n'a induit d'effet cytotoxique ni d'effet apoptotique dans les cellules HepaRG, malgré une exposition répétée de 28 jours. Néanmoins une exposition aiguë a montré que ces molécules étaient des ligands du récepteur Ah (AhR) et qu'elles modulaient les gènes cibles majeurs de AhR ainsi que, bien que plus faiblement, de nombreux autres gènes, différents après une exposition aiguë et répétée (28 jours). Les gènes les plus modulés étaient les CYP1A1 and CYP1A2 aux 2 temps de traitements et le CYP1B1 et l'ALDH3A1 après 28 jours. Les autres gènes dérégulés après 28 jours étaient liés à la prolifération cellulaire, à l'apoptose et au cancer (4).

Les effets de mélanges équimolaires des 2 amines ont en outre été testés après un traitement de 24h. Les effets synergiques ou inhibiteurs observés étaient en faveur de l'existence d'interactions entre ces 2 molécules (5).

Enfin, une analyse transcriptomique des effets aigus de l'AFB1, un puissant hépatocarcinogène chez l'homme et l'animal, a permis d'identifier de nombreux gènes cibles, notamment des gènes impliqués dans la voie p53 et des études sur l'un d'entre eux a révélé qu'il pourrait représenter un biomarqueur précoce des composés génotoxiques (6).

### **3. Principales publications**

1. Jossé R, Aninat C, Glaise D, Dumont J, Fessard V, Morel F, Poul JM, Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A. Long-term functional stability of human HepaRG hepatocytes and use for chronic toxicity and genotoxicity studies. *Drug Metab Dispos.* 2008 36:1111-8.
2. Le Hegarat L, Dumont J, Josse R, Huet S, Lanceleur R, Mourot A, Poul JM, Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A, Fessard V. Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cells by the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis.* 2010, 25:555-60.
3. Bazin E, Mourot A, Humpage AR, Fessard V. Genotoxicity of a freshwater cyanotoxin, cylindrospermopsin, in two human cell lines: Caco-2 and HepaRG. *Environ Mol Mutagen.* 2010, 51:251-9.
4. Dumont J, Jossé R, Lambert C, Anthérieu S, Laurent V, Loyer P, Robin MA, Guillouzo A. Preferential induction of the AhR gene battery in HepaRG cells after a single or repeat exposure to heterocyclic aromatic amines. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2010, 249:91-100.
5. Dumont J, Jossé R, Lambert C, Anthérieu S, Le Hegarat L, Aninat C, Robin MA, Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A. Differential toxicity of heterocyclic aromatic amines and their mixture in metabolically competent HepaRG cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2010, 245: 256-63.
6. Jossé R et al. (en préparation)

Revue :

1. Evolving concepts in liver tissue modeling and implications for in vitro toxicology. Guillouzo A, Guguen-Guillouzo C *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 2008,4:1279-1294.
2. General review on in vitro hepatocyte models and their applications. Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A. *Methods Mol. Biol.* 2010.640: 1-40. Review

### **4. Faits marquants-Retombées**

Les travaux réalisés dans le cadre de ce projet ANR ont confirmé l'originalité de la lignée d'hépatome humain HepaRG et démontré sa pertinence pour des études de toxicité aiguë et chronique des substances chimiques. Les premières données obtenues concernant les effets d'expositions chroniques de faibles doses de contaminants séparément ou en mélanges justifient son utilisation dans de plus larges études. Aucun autre modèle, y compris les hépatocytes humains en culture primaire, ne permet de telles études à long terme.

Les cellules HepaRG ont également toute leur pertinence en toxicologie génétique. Alors que l'évaluation du risque génotoxique est aujourd'hui réalisée sur la base de résultats obtenus sur des lignées cellulaires de rongeurs auxquelles est ajouté un système métabolique exogène de foie de rat, le

modèle cellulaire HepaRG devrait permettre dans le futur d'intégrer le métabolisme hépatique humain dans la réponse génotoxique des xénobiotiques et ainsi une meilleure prise en compte du processus de bioactivation en toxicologie génétique et de disposer d'un modèle plus prédictif de la cancérogenèse.

Au total, l'ensemble des résultats représente une contribution majeure à la reconnaissance des cellules HepaRG comme la lignée hépatique humaine de référence au niveau international, notamment pour l'étude des effets des produits chimiques.