

NOUVELLES STRATÉGIES D'ÉVALUATION DE LA TOXICITÉ EN TOXICOLOGIE

NEW TOXICITY ASSESSMENT STRATEGIES IN TOXICOLOGY

Par Arnaud TETE¹, Sylvie BORTOLI^{2*}, Xavier COUMOUL^{3*}

(Communication présentée le 4 mai 2023, manuscrit accepté le 12 mai 2023)

Mots-Clés : *in vitro*, modèles, lignées, organoïdes, AOP, toxicologie.

Keywords: *in vitro*, models, lines, organoids, AOP, toxicology.

INTRODUCTION

La toxicologie est la science étudiant l'influence des produits toxiques sur la santé. L'un de ses enjeux est l'évaluation de molécules avant leur mise sur le marché mais actuellement on estime que sur 100 000 molécules présentes sur le marché, 70 000 présentent une toxicité mal caractérisée. Cette évaluation est historiquement liée à l'utilisation de modèles *in vivo* (souris, rat, lapin, chat, chien, singe...). Depuis plusieurs années, ces modèles sont partiellement remis en question soit pour des questions de reproductibilité (rongeurs et cancérogène), soit pour des préoccupations éthiques liées au bien-être animal et les efforts se multiplient pour produire des modèles alternatifs, *in vitro* et *in silico* (Techniques de l'ingénieur 2022). Cette note vise à présenter un panorama non exhaustif de ces modèles alternatifs à l'expérimentation animale.

MÉTHODES D'ÉTUDE DE LA TOXICITÉ *IN VITRO*

La notion de toxicité est difficile à définir car pour certains, elle sous-entend l'engagement vers la mort cellulaire alors que pour d'autres, elle implique une perturbation d'un processus cellulaire conduisant à une modification du phénotype de la cellule. Si l'on se réfère à ces deux définitions, les mécanismes cellulaires associés à ces processus sont nombreux : altération de la viabilité cellulaire, apoptose, nécrose, modification de la prolifération, génotoxicité, épigénotoxicité, mitotoxicité

(Techniques de l'ingénieur 2022). Les toxiques peuvent être testés en faisant varier les concentrations, les temps d'exposition et le traitement peut être envisagé avec une molécule unique ou en mélange ; dans ce dernier cas, différents xénobiotiques activant différentes voies de signalisation peuvent, à des concentrations individuellement non toxiques, converger pour produire un effet toxique.

La viabilité cellulaire peut être appréhendée à l'aide de sondes d'exclusion (iodure de propidium, bleu trypan), ou d'inclusion (calcéine-AM, fluorescéine di-acétate, rouge neutre) qui permettent de détecter respectivement les cellules mortes, ou les cellules vivantes. Ces méthodologies sont en général complétées par un comptage cellulaire, une évaluation de l'activité cellulaire générale (mesure du métabolisme avec le test MTT. En cas de suspicion de mort cellulaire, la nécrose ou l'apoptose peut être détectée grâce à des marqueurs spécifiques (ex : caspases effectrices pour cette dernière) et ceci est aussi le cas pour la prolifération (ex : Ki67). Organite central de la « vie » cellulaire, la mitochondrie produit l'ATP et ses nombreuses fonctions peuvent être appréhendées soit à l'aide de dosages biochimiques, de sondes (cytométrie en flux) ou de marquages immunohistochimiques. Plus finement, une focalisation peut être réalisée sur certains de ces processus par la mesure de l'activité d'enzymes mitochondriales, du niveau d'ATP, du potentiel de membrane, de la production d'espèces réactives ou de certains métabolites dont certains influencent des processus extra-mitochondriaux (oncométabolites, épigénotoxiques).

1- Ingénieur, Courriel : arnaud.tete@u-paris.fr

2- Ingénieure, Courriel : sylvie.bortoli@u-paris.fr

3- Professeur, Courriel : xavier.coumoul@u-paris.fr

* égale contribution comme dernier auteur

Université Paris Cité, T3S, Inserm UMR S-1124, F-75006 Paris, France

La cancérogénicité d'une substance peut être mesurée à différents niveaux (très représentés en toxicologie réglementaire) : sa génotoxicité (via les tests des comètes, des micronoyaux, des cassures double-brin : gamma-H2AX ou par la mesure de l'oxydation des bases azotées), sa mutagénicité, son épigénotoxicité (via la quantification de la méthylation de l'ADN, générale ou spécifique de certaines zones du génome ou par mesure de certains microARN) ; les capacités de clonogénicité (formation d'une colonie à partir d'une cellule) ou de migration (une propriété représentative des cellules métastatiques mesurable par le test de blessure ou par le dispositif XCelligence, Agilent). L'activation ou l'inactivation de voies de signalisation peut aussi être quantifiée spécifiquement. Dans ce domaine, la reprogrammation métabolique (parfois en lien avec la mitotoxicité) est de plus appréhendée (mesure de l'effet Warburg, utilisation de la technologie SeaHorse). Enfin, la perturbation endocrinienne fait l'objet d'une attention toute particulière en toxicologie : les systèmes rapporteurs. (ex : CALUX) ou la mesure d'activités agoniste ou antagoniste peuvent être proposés.

LES MODÈLES CELLULAIRES 2D

Différents modèles peuvent être utilisés pour tester les protocoles précités :

Les cultures primaires

Celles-ci sont préparées à partir d'un organe (humain ou autre animal) après dissociation par des méthodes mécaniques et/ou enzymatiques ; le matériel d'origine peut être une biopsie ou une pièce chirurgicale non utilisée. Leurs avantages principaux sont la possible conservation des activités enzymatiques des cellules du tissu d'origine et leur caractère non tumoral mais leur maintien en culture est limité, et leur différenciation peut néanmoins s'altérer. Par ailleurs, provenant d'organe dont le génotype est unique, il peut être difficile de reproduire des réponses cellulaires aux toxiques à partir de plusieurs échantillons d'origine différente.

Les lignées cellulaires

Ces défauts peuvent être palliés par l'utilisation de lignées obtenues soit par transformation tumorale, soit par immortalisation. Commercialisées, elles sont de nature relativement homogène, stables dans leurs réponses cellulaires et présentent des capacités prolifératives presque illimitées. Elles peuvent être utilisées pour tester simultanément plusieurs mécanismes moléculaires et cellulaires.

De nature proche d'une cellule tumorale, elles ont le défaut de ne pas reproduire à l'identique les réponses d'un organe composé de multiples cellules primaires. Certains modèles ont toutefois des propriétés plus élaborées comme les Caco2, modèle intestinal qui peut être différencié en barrière pour étudier des phénomènes de transport (Natoli *et al.* 2012), les HepaRG, modèle double hépatocytaire et biliaire qui expriment de nombreuses enzymes du métabolisme des polluants (Rose S *et al.* 2022) ou les SHSY-5Y, modèle neural pouvant être différencié en cellule possédant de nombreuses caractéristiques de cellules neuronales (Lopez-Suarez *et al.* 2022).

Plus récemment, les cellules souches pluripotentes induites (ou iPS) ont été utilisées dans des programmes d'ampleur comme Toxcast (Jeong *et al.* 2022). Il s'agit de cellules pluripotentes différenciées (à l'origine des fibroblastes) par manipulation génétique qui peuvent être ensuite différenciées en de multiples types cellulaires.

Des modèles plus complexes existent, reproduisant des barrières physiologiques comme la culture des cellules respiratoires en interface air-liquide (IAL) ou le microenvironnement tumoral comme les cocultures de cellules tumorales et pré-adipocytaires (Koual *et al.* 2021).

LES MODÈLES CELLULAIRES 3D

Contrairement à ce qu'on peut imaginer, le concept n'est pas récent mais a récemment pris un réel essor avec de nombreux modèles de culture cellulaire en 3D, permettant des interactions entre la matrice extracellulaire (MEC) et les cellules. Les premiers modèles développés étaient des *sphéroïdes* c'est à dire de simples amas multicellulaires issus de lignées ou de cultures primaires, assez peu organisés. Les *organoïdes* sont ensuite apparus avec une architecture polarisée reproduisant des fonctions fondamentales de l'organe ; ceux-ci sont issus d'échantillons tissulaires ou établis à partir de cellules souches embryonnaires (CSE) ou d'iPS (voir plus haut). Dans ces architectures cellulaires, la matrice extracellulaire joue un rôle potentiel dans les communications cellulaires.

DE NOUVELLES INNOVATIONS TECHNOLOGIQUES INTÉGRATIVES

Depuis 2010, des dispositifs de système microfluidique, permettant des communications entre cellules de différentes origines sont mis en place notamment les systèmes biologiques appelés « *organ-on-chip* » ou « *body-on-chip* ». Des méthodes de « bio-impression » (ou *bioprinting*) viennent les compléter en proposant des reconstructions en 3D de tissus. Ces dispositifs miniaturisés impliquent une grande précision technologique (Puce gravée, micro-canaux, hydrogel mimant la MEC, ...). Les cellulesensemencées peuvent être maintenues plusieurs semaines dans des conditions proches du microenvironnement avec la possibilité de reproduire soit des processus physiologiques (battement cardiaque), soit physiopathologiques (métastases).

MODÈLES ANIMAUX NON MAMMIFÈRES

Certains modèles intégrés sont de plus en plus utilisés en toxicologie notamment avec des animaux non mammaliens à des stades précoces de développement. C'est le cas du :

- Poisson zèbre (*Danio rerio*), modèle facile d'entretien, peu coûteux, avec un bon potentiel reproductif. Son utilisation permet de nombreuses extrapolations à l'être humain. Ses embryons transparents permettent de suivre le devenir de certaines cellules marquées fluorescentes (utilisation par exemple pour suivre des cellules métastatiques après exposition à un toxique). Il permet de réaliser aussi des criblages haut débit (médicaments).
- *Caenorhabditis elegans*, nématode présentant de nombreux gènes homologues à des versions humaines. Ce modèle d'invertébré est utilisé en toxicologie prédictive du fait de ses nombreux

avantages expérimentaux (petite taille, toxicité, animal entier comme le poisson zèbre, reproduction rapide). Il permet lui aussi de réaliser des criblages haut débit.

APPROCHES SYSTÉMATIQUES, INTÉGRATIVES ET MÉCANISTIQUES

Ce sont des approches *in silico*, de modélisation par le biais d'ordinateurs avec potentiellement des approches impliquant des intelligences artificielles. Celles-ci se développent dans un cadre de toxicologie prédictive. Quatre grandes méthodologies ou outils peuvent être présentés dans ce cadre :

- Les approches *Quantitative structure-activity relationship* (ou QSAR) qui consistent en la corrélation entre une structure chimique donnée et une activité biologique ou chimique assez proche du « Read Across » ou prédiction par lecture croisée (Fukuchi *et al.* 2019).
- La *pharmacocinétique basée sur la physiologie (PBPK)* qui offre des modèles mathématiques permettant de prédire l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion de molécules comme des toxiques en définissant des compartiments comme dans un organisme (foie, cerveau, muscles...) (Emond *et al.* 2022).
- *Adverse Outcome Pathways* (ou AOP), c'est un modèle qui

identifie la séquence d'événements moléculaires et cellulaires nécessaires pour produire un effet toxique lorsqu'un organisme est exposé à une substance (Benoit *et al.* 2022).

CONCLUSION

La toxicologie fait face à des enjeux majeurs pour les années à venir : celui de la multiplicité des produits chimiques présents sur le marché (> 100 000), l'effet des mélanges de toxiques environnementaux, leurs effets retardés sur la santé, la prise en compte de l'impact des toxiques à la fois sur la santé humaine et sur celle des écosystèmes (le concept de santé planétaire ou *One Health*). Si l'expérimentation animale est toujours nécessaire pour évaluer les effets intégratifs de polluants de l'environnement, le développement de modèles *in vitro* et *in silico* permet désormais de se projeter vers l'émergence d'une toxicologie prédictive basée sur des modèles intégrés cellulaires et computationnels. L'attente sociétale est importante à la fois pour protéger les populations et prendre en compte le bien-être animal. Une meilleure compréhension des mécanismes de toxicité sera aussi permise par ces modèles permettant d'établir des liens de causalité qui manquent parfois aux décideurs politiques et régulateurs quant à la restriction d'usages voire, l'interdiction de substances présentes sur le marché.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient l'Université Paris Cité, l'Inserm et l'AP-HP ainsi que Elias ZGHEIB, Sana AL AWABDH, Louise BENOIT, Kévin BERNAL, Carolina DUARTE HOSPITAL, Lucie LARIGOT, Lorena LOPEZ SUAREZ, Kloé DEBIZET, Lucas GAILLARD, Jules IMLER, Karine ANDREAU, Caroline CHAUVET, Min Ji KIM, Meriem KOUAL, Céline TOMKIEWICZ-RAULET, Etienne BLANC, Karine AUDOUZE, Robert BAROUKI.

BIBLIOGRAPHIE

- Benoit L, Jornod F, Zgheib E, Tomkiewicz C, Koual M, Coustillet T *et al.* Adverse outcome pathway from activation of the AhR to breast cancer-related death. *Environ Int.* 2022 Jul;165:107323. doi: [10.1016/j.envint.2022.107323](https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107323).
- Emond C, Multigner L. Chlordecone: development of a physiologically based pharmacokinetic tool to support human health risks assessments. *Arch Toxicol.* 2022; 96(4):1009-1019. doi: [10.1007/s00204-022-03231-3](https://doi.org/10.1007/s00204-022-03231-3).
- Fukuchi J, Kitazawa A, Hirabayashi K, Honma M. A practice of expert review by read-across using QSAR Toolbox. *Mutagenesis.* 2019; 34(1):49-54. doi: [10.1093/mutage/gy046](https://doi.org/10.1093/mutage/gy046).
- Jeong J, Kim D, Choi J. Application of ToxCast/Tox21 data for toxicity mechanism-based evaluation and prioritization of environmental chemicals: Perspective and limitations. *Toxicol In Vitro.* 2022; 84:105451. doi: [10.1016/j.tiv.2022.105451](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2022.105451).
- Koual M, Tomkiewicz C, Guerrero IC, Sherr D, Barouki R, Coumoul X. Aggressiveness and Metastatic Potential of Breast Cancer Cells Co-Cultured with Preadipocytes and Exposed to an Environmental Pollutant Dioxin: An *in Vitro* and *in Vivo* Zebrafish Study. *Environ Health Perspect.* 2021 Mar; 129(3):37002. doi: [10.1289/EHP7102](https://doi.org/10.1289/EHP7102).
- Lopez-Suarez L, Awabdh SA, Coumoul X, Chauvet C. The SH-SY5Y human neuroblastoma cell line, a relevant *in vitro* cell model for investigating neurotoxicology in human: Focus on organic pollutants. *Neurotoxicology.* 2022 Sep; 92: 131-155. doi: [10.1016/j.neuro.2022.07.008](https://doi.org/10.1016/j.neuro.2022.07.008).
- Natoli M, Leoni BD, D'Agnano I, Zucco F, Felsani A. Good Caco-2 cell culture practices. *Toxicol In Vitro.* 2012 Dec;26(8):1243-6. doi: [10.1016/j.tiv.2012.03.009](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.03.009).
- Rose S, Cuvellier M, Ezan F, Carteret J, Bruyère A, Legagneux V, Nesslany F, Baffet G, Langouët S. DMSO-free highly differentiated HepaRG spheroids for chronic toxicity, liver functions and genotoxicity studies. *Arch Toxicol.* 2022 Jan;96(1):243-258. doi: [10.1007/s00204-021-03178-x](https://doi.org/10.1007/s00204-021-03178-x).
- Techniques de l'ingénieur. Alternatives *in vitro* et *in silico* aux modèles animaux en toxicologie. 10 juin 2022. Disponible à : <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/biomedical-pharma-th15/nanotechnologies-et-biotechnologies-pour-la-sante-42608210/alternatives-in-vitro-et-in-silico-aux-modeles-animaux-en-toxicologie-re295/>. Consulté le 31/05/2023