

Complémentarité des méthodes d'évaluation de la toxicité par prédiction *in silico* et par expérimentation *in vitro* : application aux perturbateurs endocriniens et au développement fœtal

Période : septembre 2009 à décembre 2009

Jacques CHRÉTIEN

BioChemics Consulting SAS – Olivet

Mots clés : Développement fœtal, Expérimentation *in vitro*, Perturbateurs endocriniens, Prédiction *in silico*, QSAR, Toxicité

Le programme européen REACH⁽¹⁾ a imposé une nouvelle politique communautaire sur la sécurité liée aux produits chimiques. À ce jour, plus de 30 000 substances importées ou produites à plus d'une tonne sont concernées. Parallèlement l'interdiction des tests sur les animaux pour les ingrédients cosmétiques est entrée en vigueur le 11 mars 2009. Le besoin de renforcer la sécurité des substances chimiques sur le plan industriel et environnemental, ainsi que l'application de nouvelles contraintes réglementaires motivent la mise au point de procédures d'évaluation par des tests *in vitro* ou *in silico*. Parmi les risques visés, les effets endocriniens et le développement fœtal appartiennent à des sujets sensibles, dans le règne animal et humain, car ils portent sur les phases pré- et post-fœtales, par exemple, le thème bis-phenol A (BPA⁽²⁾) est fréquemment abordé car des traces sont susceptibles de se retrouver dans le lait des biberons et le sang des nouveau-nés.

Mais au vu de la puissance des moyens d'analyse chimique, notamment par couplage chromatographie liquide/spectrométrie de masse (LC/MS) des traces infimes du BPA sont détectables, ainsi que bien d'autres composés, sans pour autant induire une action biologique au titre d'une toxicité potentielle si la dose efficace n'est pas atteinte. Une action de vigilance au sujet d'un risque potentiel et l'observation scientifique de ce risque supposent une totale transparence et une grande rigueur sous peine d'arriver à des discussions stériles, Erickson (2010). Ces traces incitent à se replonger dans les méthodologies et les protocoles scientifiques de vigilance sanitaire, en vue de répondre à l'objectif de la thématique de veille de la présente note, centrée sur « les méthodes alternatives à l'expérimentation animale (expérimentation *in vitro*, QSAR⁽³⁾...) ».

C'est pourquoi dans cette note, portant sur les méthodes alternatives, nous avons souhaité mettre en perspective deux types d'approches complémentaires faisant appel à des méthodes d'évaluation de la toxicité par prédiction *in silico* et par expérimentation *in vitro* dont le champ environnemental visé implique les perturbateurs endocriniens et le développement fœtal.

Intégration des modèles (Q)SAR, des systèmes experts et des approches analogiques pour la prédiction de la toxicité sur le développement

Analyse

La publication Hewitt *et al.* (2010) est basée sur une étude de toxicité reposant sur des bases statistiques. Les diverses approches utilisées exploitent les analogies structurales ou d'une façon plus générale les similarités moléculaires. Cette étude porte sur 290 composés, principalement d'origine pharmaceutique. Les niveaux de risques sont répartis en cinq catégories, selon les critères de la Food and Drug Administration (FDA⁽⁴⁾), depuis l'absence de risque détecté jusqu'à des risques éventuels sur l'Homme et l'animal.

Les auteurs passent en revue quatre types de modèles prédictifs

basés sur les composés ci-dessus :

- 1 – le modèle CAESAR⁽⁵⁾ développé avec le soutien de la Commission Européenne et accessible sur le Web ;
- 2 – le système expert Derek, sous Windows, développé par Lhasa Ltd à Leed (UK) ;
- 3 – le système OECD⁽⁶⁾ (Q)SAR⁽⁷⁻⁸⁾ Application Toolbox (version 1.1) ;
- 4 – le système Toxmatch pour classer la population de composés en sous-catégories d'analogues structuraux susceptibles d'induire des toxicités similaires.

Les diverses méthodes utilisées sont basées sur des outils commerciaux ou accessibles sur le Web. Pour améliorer le niveau de prédiction apparent les auteurs combinent les modèles au mieux, selon leur expertise, pour générer leur propre modèle optimal, relatif à la toxicité visée. Le tableau élaboré comporte 57 composés tests, les prédictions fournies par les quatre types de modèles examinés sont instructives quant à l'apport de ce travail,

à la condition toutefois de bien considérer simultanément les caractéristiques propres à chacune de ces méthodes.

Commentaire

L'article de **Hewitt et al. (2010)** demande une lecture attentive pour bien saisir les diverses sources de complexité liées aux différents facteurs impliqués qui sont passés en revue. Ces facteurs comprennent: (i) la nature des données sur le plan biologique, (ii) les méthodes pluridisciplinaires mises en œuvre et les outils correspondants, (iii) et un certain nombre de limites inhérentes à chacun de ces types de méthodes.

Cette publication correspond bien aux réalités auxquelles serait confronté, aujourd'hui, un chercheur ou un régulateur qui voudrait développer des modèles pour profiter au mieux de l'état de l'art dans le domaine QSAR, appliqués au domaine de la toxicité sur le développement.

Cependant, pour un lecteur plus averti, il apparaît nécessaire de bien distinguer, entre les deux directions rigueur et pragmatisme, sur le plan méthodologique et conduite d'un projet.

La frontière peut être tenue, et les auteurs n'ont peut-être pas toujours apporté l'attention nécessaire à une claire délimitation des deux approches. Les auteurs présentent un modèle combiné de toxicité qui vise à intégrer les résultats de chacune des approches, qu'elles soient qualitatives, avec la contribution de fragments structuraux, ou bien qu'elles soient quantitatives, avec la contribution de descripteurs moléculaires. De plus, ils ont incorporé dans ce modèle combiné des tests de décision basés sur leur propre expertise.

Mais, le risque est alors d'aboutir à des approches de circonstances et non à une méthodologie générale qui seule peut conduire à une véritable modélisation du risque toxicité. Une modélisation de portée générale suppose des bases statistiques rigoureuses. Le pragmatisme affiché dans cette publication **Hewitt et al. (2010)** est respectable, il vise à atteindre au mieux l'objectif initial. Cependant, il serait souhaitable de bien distinguer entre « un modèle d'alerte », catégorie dont relève la publication **Hewitt et al. (2010)** et un véritable « modèle de prédiction ». Le modèle d'alerte, en première intention, conduit à des procédures de vigilance alors que le modèle de prédiction, par son niveau de probabilité et de confiance supérieur doit être recherché, en deuxième intention, pour servir de support à des décisions réglementaires.

Une autre possibilité aurait été de prendre plus de recul, sur le plan conceptuel et sur le plan méthodologique, pour ne pas rester prisonnier de trop de points factuels qui finissent par s'obscurcir les uns les autres.

Par exemple, le tableau 2 qui présente l'étude comparative basée sur 57 composés tests donne 8 colonnes de résultats. Le fait que le système expert DEREK fournisse 45 « pas de réponse », confirme que son approche par fragments structuraux préalablement inventoriés n'est pas adaptée à la prédiction de la toxicité de molécules complexes. Par contre le modèle CAESAR, basé sur une analyse comportementale à l'aide de descripteurs moléculaires, couvre l'ensemble de la diversité moléculaire du jeu d'entraînement de 233 composés. Une analyse conceptuelle

préliminaire aurait allégé la conduite de l'étude, la présentation des résultats et aurait donné plus de force à la discussion et à la conclusion qui est accompagnée d'une liste de neuf commentaires.

Analyse *in vitro* du profil perturbateur endocrinien de dix composés phénoliques divers

Analyse

L'article de **Li et al. (2010)** se focalise sur les récepteurs stéroïdiens qui incluent les récepteurs aux estrogènes (ER), les récepteurs aux androgènes (AR) et le récepteur de la progestérone (PR). Dans les risques environnementaux, un effet perturbateur endocrinien potentiel sur l'homme est souvent invoqué à l'encontre des substances chimiques en général et des pesticides, en particulier. Dans cette étude, dix composés appartenant à quatre classes chimiques diverses: alkylphénols, phénols chlorés, bisphénols et phénylphénols ont été sélectionnés comme composés représentatifs. Le test *in vitro* repose sur l'utilisation de deux levures, l'une transformée avec l'insertion des gènes ER α ⁽⁹⁾, ERR γ et AR et l'autre comportant le gène PR.

Sur le plan type d'action de ces composés phénoliques et sur les relations dose/effet la publication de Li est riche d'information. Prenons à titre d'exemple trois composés analogues structuraux, le bis-phénol A et ses dérivés halogénés, bromés ou chlorés. Les résultats présentés montrent que le BPA, le TBBPA⁽¹⁰⁾ et le TCBPA⁽¹¹⁾ agissent comme ER α agonistes aussi bien que comme antagonistes AR ou PR. Mais le niveau de concentration nécessaire pour observer un effet ER α agoniste peut être significativement différent. Ainsi pour le TBBPA et le TCBPA le niveau de concentration est 10⁻³ mol/L fois plus faible que dans le cas du BPA. Par contre le BPA n'a pas présenté d'activité anti-progestérone par contre il a présenté une activité AR antagoniste dès 1,2 x 10⁻⁶ mol/L.

De plus les composés TBBPA et TCBPA présentent une activité estrogénique à 1,0 x 10⁻⁵ mol/L et une activité anti-progestérone à 1,0 x 10⁻⁸ mol/L, donc à une concentration 1 000 fois plus faible.

Commentaire

Pour la mise en œuvre de méthodes alternatives, l'exemple présenté ici à partir de la publication **Li et al. (2010)** sur les perturbateurs endocriniens, souligne en particulier la complexité des mécanismes d'action au niveau des récepteurs nucléaires, la non spécificité des mécanismes observés pour des composés appartenant à une même classe chimique, la sensibilité particulière aux concentrations testées qui peuvent induire des effets opposés.

Cette publication permet de souligner l'intérêt de disposer d'un modèle *in vitro* décrit avec précision et parfaitement reproductible, en vue d'avoir un effet de zoom, au niveau moléculaire sur les interactions possibles ligand/récepteur.

Sur le plan complexité des chemins réactionnels possibles nous nous approchons là des études de pointe, dans le domaine des

sciences du vivant, qui relèvent des études de « biologie des systèmes », fortement encouragées par ailleurs, par les instances européennes et américaines, en soutien aux politiques de santé.

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'état de l'art dans les deux domaines biologiques visés, perturbateurs endocriniens ou développement fœtal et la complexité des chemins réactionnels possibles ainsi que la non-sélectivité de nombreuses molécules susceptibles d'intervenir dans les deux cas, valident la mise en perspective de ces deux publications. En conclusion nous insisterons sur les deux points suivants, un premier plus scientifique, sur le champ des méthodes et le second, plus stratégique, c'est-à-dire plus axés sur l'évaluation du risque.

1 – Champ d'application des méthodes QSAR et nécessité des tests *in vitro*

Les méthodes QSAR sont tributaires de la qualité des données biologiques associées à des séries de composés et du contenu informationnel de ces données dont l'amplitude de la variabilité peut être associée à des variables de nature chimique ou physico-chimique.

L'intérêt des méthodes QSAR est de pouvoir cribler, virtuellement, de grand nombre de molécules, au niveau biologique, grâce à l'apport d'un jeu de données expérimentales, notamment d'origine *in vivo*, à partir duquel le modèle a été établi. C'est là tout l'intérêt des méthodes de criblage virtuel à haut débit (v-HTS⁽¹²⁾) qui ont été élaborées et validées par ailleurs en chimie médicinale (Piclin *et al.*, 2004).

Pour la mise en œuvre de méthodes alternatives, l'exemple présenté ici, à partir de la publication Li *et al.* (2010) sur les perturbateurs endocriniens, souligne, en particulier, la complexité des mécanismes d'action au niveau des récepteurs nucléaires, la non-spécificité des mécanismes observés pour des composés appartenant à une même classe chimique, ainsi que la sensibilité particulière aux concentrations testées qui peuvent induire des effets opposés.

2 – Distinction entre « modèle d'alerte » et « modèle de prédiction »

Il apparaît nécessaire de bien distinguer entre « modèle d'alerte » et « modèle de prédiction ». Par exemple, les modèles de prédiction les plus précis seront basés sur un modèle QSAR 3D⁽¹³⁾ qui conduira à un modèle quantitatif relativement rigoureux de prédiction de l'activité, en exploitant des données d'inhibition *in vitro*. Mais dans ce cas le mot modèle correspond à son sens premier, il résulte de calculs de modélisation moléculaire basés sur des interactions antagoniste/récepteur, à l'aide d'outils dérivés de la chimie quantique.

Ce n'est pas qu'un problème de forme, mais un problème de sécurité, de fiabilité dans la robustesse des résultats présentés.

La publication Hewitt *et al.* (2010) relève de la mise en œuvre de « modèle d'alerte ».

Lexique

- (1) REACH: Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals
- (2) BPA: bis-phénol A.
- (3) QSAR: Relation Quantitative Structure Activité ou Quantitative Structure-Activity Relationship.
- (4) FDA: Food and Drug Administration.
- (5) CAESAR: Computer Assisted Evaluation of industrial chemical Substances According to Regulation.
- (6) OECD: organisation de coopération et de développement économique.
- (7) (Q)SAR: si l'accent est mis sur des fragments structuraux greffés sur un même squelette on parlera de relations structure-activité, ou Structure Activity Relationships (SAR). Dans ce cas la relation est qualitative et non quantitative, cette possibilité supplémentaire est symbolisée par les deux parenthèses.
- (8) QSAR 2D: Modèles de Relations Quantitatives Structure Activité, établis à partir des descripteurs moléculaires 2D pertinents qui sont exprimés sous la forme d'un nombre résultant d'une expression mathématique utilisant des données topologiques, physicochimiques ou descriptives.
- (9) ERα: récepteurs aux estrogènes de type α.
- (10) TBBPA: tétrabromobisphénol A.
- (11) TCBPA: tétrachlorobisphénol A.
- (12) v-HTS: Virtual HighThroughput Screening ou criblage virtuel à haut débit.
- (13) QSAR 3D: Relations Structure-Activité Quantitatives basées sur une représentation 3D optimisée, à partir de structures cristallographiques ou par chimie quantique, qui permet le maillage de surfaces de potentiel traduisant les propriétés stériques, électroniques et lipophiliques.

Publications analysées

Hewitt M, Ellison CM, Enoch SJ *et al.* Integrating (Q)SAR models, expert systems and read-across approaches for the prediction of developmental toxicity. *Reprod. Toxicol.* 2010 ; 30(1):147-60. Sous presse en 2009.

Li J, Ma M, Wang Z. *In vitro* profiling of endocrine disrupting effects of phenols. *Toxicol. In Vitro.* 2010 ; 24(1):201-7. Sous presse en 2009.

Publications de référence

CAESAR (Computer Assisted Evaluation of industrial chemical Substances According to Regulations). <http://www.caesar-project.eu/>

Piclin Ng, Pintore M, Wechman C et al. Classification of a large anticancer data set by adaptive fuzzy partition. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2004; 18(7-9):577-86.

Revue de la littérature

Erickson BE. FDA raises flag on bisphenol A. *Chemical & Engineering News.* 2010; 88(4):8.

Gu C, Ju X, Jiang X et al. Improved 3D-QSAR analyzes for the predictive toxicology of polybrominated diphenyl ethers with CoMFA/CoMSIA and DFT. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2010; 73(6):1470-9.

Zhao YH, Yuan X, Su LM et al. Classification of toxicity of phenols to *Tetrahymena pyriformis* and subsequent derivation of QSARs from hydrophobic, ionization and electronic parameters. *Chemosphere.* 2009; 75(7):866-71.

Zvinavashe E, Du T, Griff T et al. Quantitative structure-activity relationship modeling of the toxicity of organothiophosphate pesticides to *Daphnia magna* and *Cyprinus carpio*. *Chemosphere.* 2009; 75(11):1531-8.

Publications non sélectionnées

Échantillonnage de publications intéressantes à des titres divers dont les tests *in vitro* mais qui sont en dehors du domaine biologique retenu dans la présente note.

Neuwoehner J, Reineke AK, Hollender J et al. Ecotoxicity of quinoline and hydroxylated derivatives and their occurrence in groundwater of a tar-contaminated field site. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2009; 72(3):819-27.

Thomas PC, Velthoven K, Geurts M et al. Bioavailability and detoxification of cationics: II. Relationship between toxicity and CEC of cationic surfactants on *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) in artificial and natural substrates. *Chemosphere.* 2009; 75(3):310-8.

Vighi M, Migliorati S, Monti GS. Toxicity on the luminescent bacterium *Vibrio fischeri* (Beijerinck). I: QSAR equation for narcotics and polar narcotics. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2009; 72(1):154-61.

Mots clés utilisés pour la recherche bibliographique

Alternatives procedures, *In silico*, *In vitro*, QSAR, SAR, Toxicity, Toxicity prediction.