

Les modèles de neurotoxicologie *in vitro* : des outils performants dans la perspective des nouvelles stratégies d'évaluation du risque neurotoxique lié à l'exposition de l'Homme aux produits chimiques

Période : septembre 2009 à avril 2010

Henri SCHROEDER

Nancy Université – Unité de recherche « Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux » – INRA UC340 – Vandœuvre-lès-Nancy

Mots clés : Cultures cellulaires, Développement cérébral, Exposition précoce, Neurodégénérescence, Neurotoxicité *in vitro*, Substances chimiques

Alors que de nombreux produits chimiques tels que des produits phytosanitaires (herbicides, pesticides, fongicides), des métaux (aluminium, plomb, mercure, etc.) ou des retardateurs de flammes (polychlorobiphényles, polybromodiphényléthers) sont considérés comme pouvant potentiellement contribuer à l'émergence de troubles neurodégénératifs (Brown *et al.*, 2005 ; Cory-Slechta *et al.*, 2008), la question reste posée quant aux modèles à utiliser en neurotoxicologie pour identifier les substances chimiques capables d'induire une toxicité à court et à long terme et caractériser les mécanismes impliqués dans la neurotoxicité et la neurodégénérescence qui en résulte. En effet, l'accroissement du niveau d'exposition aux produits chimiques de la population générale et en milieu professionnel, l'augmentation du nombre de substances chimiques nouvellement synthétisées et les contraintes imposées par la réglementation comme le programme REACH⁽¹⁾ (Hartung, 2009 ; Hartung et Rovida, 2009) font que les approches traditionnelles qui sont utilisées en toxicologie et qui sont basées sur l'expérimentation animale ne permettent pas de répondre à elles seules à la question de ce risque neurotoxique. Si le niveau d'organisation cellulaire et moléculaire dont relève la neurodégénérescence peut être abordé au niveau des modèles animaux, de telles études sont lourdes à mettre en œuvre et ne permettent pas de faire le criblage d'un nombre important de produits. De plus, ces approches expérimentales nécessitent de mettre en œuvre des nombres importants d'animaux, ce qui pose des questions par rapport aux recommandations relevant de l'éthique et du bien-être animal. C'est pourquoi de nouvelles stratégies basées sur l'utilisation de modèles *in vitro* (cultures cellulaires, coupes épaisses) et le recours à des approches s'appuyant sur des techniques dites à haut débit de type « omique » et de la bioinformatique sont actuellement développées dans le domaine de la toxicologie, et appliquées à l'étude de la neurotoxicité potentielle des produits chimiques (Hogberg *et al.*, 2009 ; Leist *et al.*, 2008 ; Van Vliet *et al.*, 2008).

Les modèles de neurotoxicologie *in vitro* contribuent à la compréhension des mécanismes impliqués dans les processus neurodégénératifs

Analyse

Dans cette publication, les auteurs (Zurich et Monnet-Tschudi, 2009) rapportent de nombreux éléments visant à montrer que les modèles de cultures cellulaires sont des outils performants pour répondre aux questions posées actuellement en neurotoxicologie, à savoir l'évaluation rapide, quantitative et qualitative de la toxicité cérébrale des substances chimiques dans des conditions proches de l'exposition humaine, notamment en matière de doses. Dans une première partie sont rapportés les mécanismes moléculaires impliqués dans la neurodégénérescence en soulignant que ces mécanismes sont interdépendants et que la séquence de ces événements reste à

élucider. Les processus neurodégénératifs sont ainsi caractérisés par l'accumulation de protéines dont l'arrangement spatial est perturbé (peptide β amyloïde et protéine tau dans la maladie d'Alzheimer, α -synucléine dans la maladie de Parkinson), ce qui va perturber le fonctionnement cellulaire et activer des mécanismes toxiques pour la cellule (activation de la réponse inflammatoire⁽²⁾, activation des mécanismes d'excitotoxicité⁽³⁾, blocage du transport axonique⁽⁴⁾, génération de la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène⁽⁵⁾). Cette accumulation est liée à un dysfonctionnement du système cellulaire qui contrôle la qualité des protéines produites et dégrade les molécules aberrantes (molécules chaperonnes, système ubiquitine/protéasome⁽⁶⁾, dégradation lysosomale), lequel dysfonctionnement semble pouvoir être imputé à des perturbations de la physiologie mitochondriale. En effet, la mitochondrie, parce qu'elle régule l'homéostasie cellulaire calcique⁽⁷⁾, les voies de production des radicaux libres dérivés de l'oxygène, et l'équilibre entre les

mécanismes pro- et anti-apoptotiques⁽⁸⁾, est un acteur essentiel du bon fonctionnement de la cellule. Tout dysfonctionnement de la physiologie mitochondriale est donc à même d'altérer la stabilité de la cellule et semble être une clé centrale dans la physiopathologie des processus neurodégénératifs. Dans une deuxième partie plus succincte de l'article sont mentionnés des exemples de produits chimiques capables d'induire l'un ou l'autre de ces processus neurodégénératifs *in vitro*. Par exemple, des métaux comme l'aluminium ou le mercure ainsi que des pesticides sont rapportés comme étant capable de déclencher la sécrétion et l'accumulation de ces protéines aberrantes dans des modèles de lignées cellulaires⁽⁹⁾ d'origine nerveuse en culture. Le plomb est également décrit comme étant capable d'induire des déficiences dans l'activité de molécules chaperonnes dans des cultures d'astrocytes. Enfin, de nombreux travaux montrent la capacité du méthylmercure, de pesticides et d'insecticides à activer les systèmes de production de radicaux libres dérivés de l'oxygène dans différents modèles de cellules nerveuses en culture. Parce qu'ils perturbent des mécanismes impliqués dans la neurodégénérescence *in vitro*, plusieurs composés appartenant à ces différentes familles de produits chimiques ont été identifiés comme étant neurotoxiques et sont présumés comme pouvant induire un processus neurodégénératif au niveau cérébral. Enfin, en se basant sur le fait qu'un modèle de culture cellulaire « idéal » se doit d'inclure toutes les types de cellules nerveuses⁽¹⁰⁾ (neurones, astrocytes, oligodendrocytes, microglie) et ainsi de permettre les multiples interactions cellulaires qui existent dans le cerveau, la dernière partie de l'article présente des éléments de stratégies à prendre en compte dans le développement de modèles *in vitro* performants appliqués à la neurotoxicologie. En particulier est soulignée la nécessité d'avoir des modèles intégrant la dimension des interactions cellulaires. Deux stratégies *in vitro* sont ainsi rapportées, les cultures de cellules nerveuses tridimensionnelles⁽¹¹⁾ et les coupes de tissu maintenues en conditions de survie. Dans le premier cas, il s'agit de cellules obtenues à partir de tissu cérébral embryonnaire par dissociation mécanique qui vont s'agréger entre elles une fois mises en culture pour former des structures cellulaires tridimensionnelles. Ces préparations comprennent donc les différents types de cellules nerveuses qui en s'agrégeant entre elles vont pouvoir interagir par contact direct et par échanges de différents signaux chimiques. Une activité électrique spontanée et après stimulation a été mesurée dans de tels systèmes démontrant l'existence de réseaux neuronaux fonctionnels. Enfin, ce type de préparation permet de mesurer par des techniques de biologie cellulaire et moléculaire appropriées différents signaux relevant des mécanismes impliqués dans les processus neurodégénératifs. Le deuxième type de préparation consiste en des coupes de tissu cérébral placées dans un milieu de survie. Elles permettent de préserver l'intégrité du tissu cérébral de la région anatomique du cerveau dont elles sont issues, la fonctionnalité des réseaux neuronaux à l'échelon local, et les interactions entre les différents types de cellules nerveuses. Ces modèles *in vitro* sont avant tout utilisés pour mesurer l'activité électrique des neurones par des techniques d'électrophysiologie. Ces deux stratégies sont utilisées en neurotoxicologie et ont

été appliquées à l'étude de la toxicité de plusieurs familles de polluants comme des métaux lourds, des pesticides ou des insecticides de type organophosphoré. Un dernier point évoqué dans cet article souligne que l'intérêt de tels modèles dans le criblage du potentiel neurotoxique des produits chimiques dépend de l'efficacité des outils de mesure qui sont couplés à ces systèmes *in vitro*. Un concept important est que la fiabilité et l'efficacité de ces mesures ne peuvent être obtenues qu'en mesurant de nombreux paramètres simultanément et non en se limitant à l'évaluation d'un ou deux marqueurs aussi pertinents soient-ils. Est ainsi rapporté l'exemple de la méthodologie de criblage développée dans le cadre du programme AcuteTOX⁽¹²⁾ de manière à accroître le caractère prédictif des résultats obtenus en terme de risque neurotoxique et de toxicité systémique à court terme pour l'Homme.

Commentaire

Bien que ne se rapportant pas à un travail de recherche précis, cette publication (Zurich et Monnet-Tschudi, 2009) a été retenue car elle apporte de nombreux éléments montrant clairement l'intérêt des modèles de neurotoxicologie *in vitro* d'une part pour identifier des produits à risque par leur capacité à induire un mécanisme neurodégénératif et d'autre part, pour caractériser le ou les mécanismes impliqués dans les propriétés neurotoxiques de ces produits. Ces modèles sont d'autant plus prédictifs qu'ils sont proches de la réalité du tissu cérébral *in vivo* et qu'ils sont couplés à des outils de mesure permettant d'aborder de nombreux signaux simultanément. Un autre intérêt qui n'a été que peu évoqué dans cet article est que les modèles *in vitro* permettent de tester la toxicité des produits chimiques à des doses faibles représentatives de la réalité de l'exposition humaine alors que les doses abordées dans les modèles animaux relèvent de concentrations plus élevées.

Les études de neurotoxicologie développementale *in vitro* : quels modèles ? Quelles finalités ?

Analyse

La toxicité des produits chimiques pour le cerveau en développement est à l'heure actuelle une question cruciale à laquelle les modèles animaux habituellement utilisés ne permettent de répondre que partiellement. Cette publication (Bal-Price *et al.*, 2010) qui est le fruit d'échanges ayant eu lieu lors d'une session spécifique du colloque de l'Association Internationale de Neurotoxicologie en 2009 à Jerusalem, vise à présenter plusieurs modèles *in vitro* qui paraissent prometteurs dans le cadre d'une démarche d'évaluation d'un risque de neurotoxicité développementale et d'étude des processus neurodégénératifs. Trois modèles (les cultures primaires de cellules granulaires de cervelet, les cultures de cellules souches neurales humaines et les modèles de cultures tridimensionnelles de cellules nerveuses) sont ainsi rapportés

dans cet article et s'avèrent être pertinents pour l'étude de cette forme de toxicité puisqu'ils incluent différents aspects du développement cérébral⁽¹³⁾ tels que la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire.

Le premier d'entre eux est celui des cultures primaires de cellules granulaires de cervelet. Ce modèle consiste à cultiver des cellules granulaires de cervelet obtenues par dissociation du tissu cérébelleux prélevé sur des rats âgés de 7 jours de vie postnatale (J7), la phase de développement de ces cellules étant comprise entre J0 et J10. Les cellules deviennent matures après 8 à 10 jours de culture, sont en majorité des cellules granulaires (85 %) et sont fonctionnelles au plan de la transmission glutamatergique. Ce système est d'autant plus intéressant qu'il s'agit d'un modèle de culture représentatif du cerveau humain puisqu'il permet le développement simultané des différents types cellulaires présents dans le tissu nerveux (neurones, cellules gliales, précurseurs) qui vont interagir entre eux. L'exposition à des produits chimiques de ces cellules lors d'une phase essentielle de leur développement peut donc permettre d'identifier ces substances comme potentiellement toxiques. À titre d'exemple est rapportée une étude utilisant ce modèle *in vitro* appliqué à l'étude des propriétés de plusieurs produits toxiques pour le développement cérébral (méthylmercure, plomb, acide valproïque, parathion et autres pesticides). Les résultats ont montré des anomalies dans l'expression de plusieurs classes de gènes relevant de la différenciation neuronale, de la maturation neuronale, de la prolifération et de la différenciation des astrocytes, ou bien de la présence de cellules nerveuses précurseurs, qui sont corrélées à des modifications morphologiques des cellules observées par des techniques d'imagerie cellulaire. La classe de gènes dont l'expression est perturbée permet donc de renseigner non seulement le type de cellules affecté par les produits chimiques testés (neurones, cellules gliales, précurseurs) mais aussi la période du développement cérébral à laquelle cette sensibilité existe (prolifération, différenciation ou maturation cellulaire).

Le second modèle consiste en des cultures de cellules souches⁽¹⁴⁾ neurales humaines. Ces cellules souches sont isolées à partir de sang du cordon ombilical. Dans des conditions de culture définies, elles vont se développer pour donner des cellules nerveuses depuis la formation d'agrégats de cellules souches au stade le moins avancé jusqu'à des cellules différenciées en neurones, astrocytes, et oligodendrocytes au stade le plus mature. Les systèmes cellulaires ainsi obtenus sont pour la plupart des neurones (> 80 %) qui expriment plusieurs types de récepteurs et de neurotransmetteurs ainsi qu'une activité électrique comparables à ce qui est observé au niveau de neurones en développement *in vivo*. Les techniques de cytologie et d'immunocytochimie utilisées ont ainsi permis de montrer la toxicité de produits chimiques comme le méthylmercure, le chlorpyrifos ou le chlorure de cadmium lorsque ces cultures sont exposées lors des stades les plus précoces du développement cellulaire par rapport à une exposition survenant plus tardivement au cours de ce processus. Parce que ce type de culture est un modèle de développement multicellulaire, il peut permettre comme celui mentionné précédemment, de déterminer aussi bien le type de

cellules nerveuses que le stade de développement pouvant être affectés par les substances testées.

Le troisième modèle présenté est celui de cultures tridimensionnelles de cellules nerveuses. Ce système consiste à mettre en culture des cellules souches embryonnaires de souris qui vont se développer au sein d'un support poreux à base d'hydrogel placé dans un réacteur de culture cellulaire en formant un réseau de neurones dans les trois dimensions. En plaçant une électrode de stimulation et une électrode d'enregistrement de part et d'autre du réseau, il est possible d'enregistrer l'activité électrique spontanée ou après stimulation des neurones, et ce dans des conditions dites contrôles ou après exposition du système à une substance chimique. Parce qu'il permet de modéliser des réseaux de neurones en trois dimensions, ce système est à même de reproduire *in vitro* l'activité électrique qui est observée lors de l'apprentissage et la mémorisation *in vivo*. La mise en culture de cellules provenant d'animaux transgéniques⁽¹⁵⁾ déficients dans l'expression de protéines impliquées dans l'apprentissage peut alors permettre d'éviter le recours aux modèles animaux complets et de caractériser la toxicité de produits chimiques sur les fonctions cognitives. Il s'agit là encore d'un modèle permettant le développement des différents types cellulaires présents dans le cerveau (neurones et cellules gliales) et les interactions cellulaires entre eux. L'activité électrique qui est enregistrée se modifie au cours du temps selon le stade de développement et de différenciation de la préparation, ce qui permet d'intégrer le stade de développement auquel les neurones seraient sensibles à une exposition à un produit chimique.

Commentaire

Par rapport à des modèles de culture cellulaire utilisés depuis plus longtemps, ces nouveaux modèles *in vitro* de neurotoxicologie développementale se rapprochent beaucoup plus de la réalité du développement du tissu cérébral *in situ* et peuvent permettre de suppléer efficacement aux modèles animaux utilisés jusqu'alors. Ils constituent sans aucun doute une voie d'avenir prometteuse pour répondre aux enjeux de l'évaluation du risque neurotoxique lié à l'utilisation des produits chimiques par l'Homme. Pour autant, ils se doivent d'être évalués au plan de leur fiabilité en utilisant des produits chimiques de référence dont la toxicité est connue pour évaluer le risque de faux négatifs ainsi que des produits dont l'innocuité est avérée pour estimer le risque de faux positifs. Comme il a été dit plus tôt dans la note, il faut également multiplier les marqueurs à mesurer dans ces modèles pour accroître leur sensibilité et leur spécificité au-delà de ceux qui sont d'ores et déjà étudiés comme la mesure de l'activité électrique ou de l'expression de gènes spécifiques. Ainsi, les mesures de la viabilité cellulaire et de la morphologie de la cellule, l'investigation du stress oxydant intracellulaire ou bien l'analyse de la modulation de la réponse cellulaire par voie pharmacologique constituent, sans pour autant être exhaustif, autant de possibilités pour augmenter les performances de ces modèles.

Application d'un modèle *in vitro* de cellules souches humaines à l'étude de la neurotoxicité développementale des polybromodiphényléthers

Analyse

Les neurosphères constituent un modèle *in vitro* qui est de plus en plus utilisé dans le domaine de la neurotoxicité développementale car la formation de ces structures cellulaires tridimensionnelles procède des mêmes événements clés que ceux observés lors du développement du cerveau *in vivo* et qui sont la prolifération, la migration et la différenciation des cellules souches. La culture de neurosphères repose donc sur une succession d'étapes permettant d'aborder à chacune d'entre elles ces différents stades du développement cérébral. Selon le moment de l'exposition du modèle cellulaire aux contaminants, il est ainsi possible de cerner quelles sont les phases du développement cérébral les plus sensibles à l'action des molécules étudiées. Pour donner quelques éléments quant à cette technique de culture cellulaire, la première étape dite de prolifération consiste à mettre en culture dans un milieu liquide des cellules souches neurales humaines en présence du facteur de croissance approprié. Chaque cellule souche va alors proliférer et former un clone de cellules indifférenciées qui pousse en suspension dans le milieu et forme ainsi un agrégat cellulaire tridimensionnel constituant une neurosphère dite primaire. La simple mesure de l'évolution de la taille de la neurosphère au cours d'une période donnée va permettre d'évaluer la croissance de cette structure et donc la capacité des cellules la constituant à proliférer. La deuxième étape du processus de culture cellulaire est celle de la migration. Elle consiste à remettre en culture les cellules de la neurosphère primaire préalablement dissociées dans un milieu de culture additionné de facteur de croissance en présence d'un support adhérent. Ces cellules vont alors donner naissance à de nouvelles neurosphères dites secondaires. Au cours de la formation de ces nouvelles structures, des cellules vont se détacher et s'éloigner de la neurosphère selon un processus migratoire. La mesure de la distance séparant ces cellules de la neurosphère lors de cette période permet donc de quantifier la capacité de migration des cellules. Enfin, dans une troisième étape qui consiste à retirer le facteur de croissance présent dans le milieu, les cellules constituant les neurosphères vont arrêter de se diviser et vont alors se différencier en neurones ou en cellules gliales. Le marquage des cellules par des techniques d'immunohistochimie avec des sondes spécifiques des neurones ou des cellules gliales va alors permettre de dénombrer chaque type cellulaire et attester ainsi de la capacité de différenciation des cellules présentes dans la neurosphère. L'étude qui est présentée ici a visé à fournir des éléments quant à la toxicité potentielle pour le cerveau en développement des composés 47 et 99 de la famille des polybromodiphényléthers⁽¹⁶⁾ (PBDE) en utilisant un modèle de neurosphères généré à partir de cellules souches neurales humaines. Les résultats ont montré que l'exposition des cellules à des concentrations croissantes de PBDE

47 ou 99 (0,1, 1 ou 10 µM) pendant 7 jours au cours de l'étape de prolifération n'a pas altéré les capacités des cellules progénitrices à se diviser. Par contre, la présence de ces deux contaminants dans le milieu de culture aux mêmes concentrations lors de la formation des neurosphères secondaires sur support adhérent a induit une diminution dose-dépendante des capacités de migration des cellules après 48 heures d'exposition ainsi que du taux de différenciation des cellules en neurones ou en oligodendrocytes 7 jours après le début de la contamination du milieu. Enfin, l'adjonction dans le milieu de culture de l'hormone thyroïdienne T₃⁽¹⁷⁾ a permis de restaurer la migration et la différenciation des cellules en présence des 2 contaminants. Ces résultats indiquent donc la toxicité des PBDE 47 et 99 pour le cerveau en développement à des concentrations qui se veulent représentatives de la réalité humaine en inhibant aussi bien la migration que la différenciation des cellules souches en neurones et cellules gliales. Cette étude montre également que la toxicité de ces composés pourrait s'exercer en perturbant la fonction thyroïdienne dont le rôle prépondérant dans le développement cérébral est établi.

Commentaire

Alors que cette publication (Schreiber *et al.*, 2010) aurait pu faire partie d'une note consacrée à la neurotoxicité induite par les PBDE, ce travail est présenté ici dans le but de fournir au lecteur une réalité quant à l'intérêt que présentent ces modèles *in vitro* pour l'étude de la neurotoxicité potentielle des produits chimiques. Développées au cours des années 1990, les neurosphères sont maintenant des modèles de cultures cellulaires dont la pertinence est avérée dans de nombreux domaines dont ceux des neurosciences ou de la neurotoxicologie développementale. Dans le cas présent, les résultats obtenus avec un tel modèle vont dans le sens de la toxicité déjà démontrée dans des modèles animaux de ces 2 PBDE. Pour autant, la présente étude, parce qu'elle est menée *in vitro*, a permis d'aborder le rôle de la fonction thyroïdienne dans la neurotoxicité induite par ces 2 composés. Ceci aurait bien sûr été possible chez l'animal mais au prix d'expérimentations sans doute plus lourdes à mettre en œuvre. Enfin, il est à signaler que le maintien des cellules constituant les neurosphères secondaires dans des conditions de culture en présence de facteurs de croissance permet par repiquage successif de maintenir ces cellules dans un état indifférencié pendant de longues périodes et donc d'obtenir des lignées de cellules souches neurales stables au cours du temps. Cette possibilité est toute à fait intéressante dans le domaine de la neurotoxicologie développementale car elle garantit que les produits chimiques testés au cours du temps le sont sur des cellules ayant toujours la même origine et que les résultats peuvent être comparés d'une expérience à l'autre en ayant l'assurance de la stabilité du modèle d'exposition utilisé au-delà de la variabilité propre à chaque expérimentation.

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'évaluation de la toxicité d'un produit chimique s'appuie traditionnellement sur des études menées chez l'animal qui sont longues, coûteuses et posent des questions d'ordre éthique. Depuis de nombreuses années, le domaine de la toxicologie en général, et de la neurotoxicologie en particulier, cherche à développer des méthodes alternatives exploitant des tissus ou des cellules animales ou humaines qui pourraient se substituer aux études animales tout en étant prédictives de la toxicité chez l'Homme. C'est dans ce cadre que sont utilisés de nombreux modèles de cultures cellulaires mais qui jusqu'à présent ne mettaient en jeu qu'un seul type de cellule avec un taux de prédiction d'une toxicité humaine relativement peu satisfaisant. Au cours des années récentes, le développement de nouveaux modèles de neurotoxicité *in vitro* impliquant le développement simultané de plusieurs types cellulaires a permis de se rapprocher de la réalité du cerveau humain et semble en mesure d'accroître le caractère prédictif des études de toxicité réalisées avec ces modèles. Pour autant, la performance de ces modèles ne vaut que par les marqueurs qui peuvent être mesurés dans ces modèles. Ainsi, les techniques de type « omiques », les méthodes d'imagerie cellulaire et leur robotisation sous forme de plateformes automatisées laissent voir la possibilité de pouvoir tester dans un laps de temps raisonnable un nombre plus grand de molécules et donc de répondre aux attentes des nouveaux programmes réglementaires comme le programme REACH ou le 7^e amendement de la législation sur les produits cosmétiques. Cependant, les modèles animaux restent d'actualité dans des domaines comme les études de toxicité chronique, de toxicité retardée et/ou de toxicocinétique. Les stratégies actuelles visent donc à combiner les approches *in vitro* et *in vivo* de manière à accroître le caractère prédictif des résultats obtenus tout en limitant le risque de faux positifs. La mise en place d'outils de bioinformatique est également indispensable non seulement pour analyser les données mais aussi pour stocker les résultats dans des bases de données adéquates pour permettre à terme la réalisation d'outils de modélisation pouvant être intégrés dans ces schémas stratégiques d'évaluation du risque neurotoxique d'origine chimique (Merlot, 2010; Simon-Hettich *et al.*, 2006).

Lexique

- (1) Le programme REACH: il s'agit d'une réglementation européenne qui a été adoptée le 17 novembre 2005 et qui porte sur l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et la restriction des substances chimiques. Son objectif est d'améliorer la protection de la santé humaine et de l'environnement tout en maintenant la compétitivité de l'industrie chimique européenne. Toute entreprise qui fabrique et/ou importe des substances chimiques se doit donc d'évaluer les risques liés à l'utilisation de ces produits, de prendre les mesures nécessaires pour gérer les risques ainsi identifiés, et de faire ainsi la preuve de la sécurité des substances chimiques. Ces informations sont enregistrées au niveau de bases de données et devraient permettre à terme d'éliminer les produits présentant un risque non négligeable et difficilement gérable.
- (2) La réponse inflammatoire: ce terme désigne l'ensemble des processus réactionnels qui se déclenchent dans un organisme vivant en réponse à une agression pour limiter et réparer les effets de cette agression. Cette réponse met en œuvre des processus de défense immunologique à l'échelon local (réparation d'une plaie localisée) ou global (lutte contre une infection liée à la présence d'un agent infectieux) de l'organisme. La réaction inflammatoire peut être déclenchée par des causes externes (agents infectieux, contact avec un allergène, traumatisme, etc.) ou internes à l'organisme (dégénérescence cellulaire, troubles de la vascularisation, perturbations métaboliques, conflit immunitaire, etc.).
- (3) Les mécanismes d'excitotoxicité: l'excitotoxicité est un processus pathologique qui peut aboutir à des altérations voire à la destruction de la cellule *via* la libération accrue de glutamate et la mobilisation massive du calcium à l'intérieur de la cellule. Cette augmentation trop importante du calcium intracellulaire va alors activer de manière irréversible des enzymes qui vont participer à la destruction de la cellule.
- (4) Le transport axonique: dans le neurone, les protéines sont synthétisées au niveau du corps cellulaire puis sont transportées le long de l'axone vers la terminaison synaptique selon un mécanisme de transport axoplasmique. Le transport axoplasmique existe dans les deux sens: il est dit antérograde lorsqu'il a lieu du corps cellulaire vers l'extrémité de l'axone, et rétrograde lorsqu'il a lieu dans le sens inverse.
- (5) Les radicaux libres dérivés de l'oxygène: en chimie, le terme radical désigne une entité chimique qui possède un ou plusieurs électrons célibataires. De ce fait, un radical présente une grande instabilité qui l'amène à réagir avec de nombreux composés dans des processus aspécifiques. Il possède donc une durée de vie très courte. En biologie, a été identifiée une classe spécifique de radicaux tous dérivés de l'oxygène. Produits à l'échelon cellulaire, ces radicaux sont pris en charge et neutralisés par des systèmes anti-oxydants intracellulaires. Dès lors, les radicaux libres dérivés de l'oxygène ne deviennent toxiques pour la cellule que lorsque ses capacités anti-oxydantes sont dépassées.

- (6) Système ubiquitine/protéasome: il s'agit d'un système qui permet à la cellule de préserver son homéostasie en détruisant de manière sélective des protéines intracellulaires et en évitant ainsi l'engorgement de l'espace cytoplasmique. L'ubiquitine est une protéine de 76 acides aminés qui est présente dans toutes les cellules eucaryotes et qui va servir de marqueur pour identifier les protéines à éliminer. Les protéasomes sont des complexes enzymatiques multiprotéiques que l'on retrouve dans les cellules eucaryotes mais aussi chez certaines bactéries et dont le rôle est de dégrader par protéolyse les protéines marquées avec l'ubiquitine. Le système fonctionne donc en deux grandes étapes: la première consistant en l'ubiquitination de la protéine, c'est-à-dire la conjugaison de la protéine avec au moins 4 molécules d'ubiquitine, et la seconde qui est la protéolyse de la protéine ainsi identifiée par le protéasome adéquat.
- (7) L'homéostasie cellulaire calcique: le calcium est un élément clé de la signalisation intracellulaire. Sa concentration dans la cellule est finement régulée selon un état d'équilibre entre les entrées, les sorties et le stockage dans des compartiments intracellulaires comme le réticulum endoplasmique qui est désigné par ce terme d'homéostasie calcique. La rupture de cet équilibre est l'un des facteurs qui est à la base des processus neurodégénératifs qui sont impliqués de nombreuses pathologies cérébrales.
- (8) Les mécanismes pro- et anti-apoptotiques: l'apoptose est un processus physiologique de mort cellulaire qui est génétiquement programmé, hautement régulé, et nécessaire à la survie des organismes pluricellulaires. La régulation passe par l'activation de mécanismes qui peuvent induire le processus apoptotique (signaux pro-apoptotiques) ou au contraire l'induction de mécanismes cellulaires qui vont s'opposer au déclenchement de l'apoptose (signaux anti-apoptotiques). L'équilibre entre les signaux pro- et anti-apoptotiques amène alors la cellule à s'engager ou non dans le processus de mort cellulaire selon le signal prédominant.
- (9) Les lignées cellulaires: une lignée cellulaire est formée d'une population homogène de cellules ayant en théorie la capacité illimitée de se diviser. D'origine cancéreuse, ces cellules sont immortalisées par modification de leur contenu génétique dans un processus dit de transformation. L'avantage des lignées cellulaires est qu'elles constituent un outil stable au plan des caractéristiques des cellules ainsi cultivées, ce qui garantit la reproductibilité des résultats obtenus. Alors qu'elles sont d'usage plus aisé que les cultures primaires de cellules, l'interprétation possible des résultats obtenus avec ces lignées reste limitée du fait de l'origine cancéreuse de ces cellules.
- (10) Différents types de cellules nerveuses: le système nerveux est formé de deux types de cellules: les neurones et les cellules gliales. Les neurones sont des cellules excitables qui se transmettent de l'information codée sous forme de signaux électriques au sein de réseaux de neurones. L'axone et les dendrites sont les prolongements cellulaires le long desquels se propagent ces signaux électriques. Estimés au nombre de 100 milliards, ils constituent l'unité fonctionnelle de base du système nerveux. Les cellules gliales sont 50 à 100 fois plus nombreuses et jouent un rôle tout aussi essentiel dans la fonctionnalité cérébrale bien qu'elles ne conduisent pas d'influx nerveux. Il existe trois grands types de cellules gliales: les astrocytes, les oligodendrocytes et la microglie. Au-delà du support mécanique qu'ils apportent, les astrocytes jouent un rôle dans le métabolisme énergétique des neurones, participent à l'équilibre du milieu extracellulaire, et sont impliqués dans le catabolisme et l'élimination des produits du métabolisme neuronal. Les oligodendrocytes sont à l'origine de la gaine de myéline qui entoure l'axone de nombreux neurones et qui permet d'accélérer la vitesse de conduction de l'influx nerveux. Les cellules de la microglie appartiennent au groupe des macrophages et jouent le rôle de cellules immunitaires au niveau central.
- (11) Structure cellulaire tridimensionnelle: si les systèmes de culture de cellules nerveuses en monocouches utilisées jusqu'à présent ont permis de faire de grandes avancées dans le domaine des neurosciences, ces modèles présentent certaines limites du fait qu'ils sont simples et ne représentent pas la complexité du tissu nerveux dans toutes ces dimensions. Les systèmes de culture cellulaire tridimensionnelle visent donc à reconstituer le tissu nerveux dans ses trois dimensions en intégrant les différents types de cellules constitutives de ce tissu que sont les neurones et les différents types de cellules gliales. L'avantage est que de tels systèmes permettent ainsi aux cellules de constituer des réseaux de neurones s'organisant non seulement dans un plan mais aussi dans l'espace comme ils le sont au sein du tissu cérébral.
- (12) Le programme AcuteTOx: AcuteTOx est un programme de recherche européen qui a rassemblé 37 partenaires de 2005 à 2010 pour développer une stratégie basée exclusivement sur des modèles *in vitro* dans le but d'évaluer de manière fiable et précise la toxicité aiguë d'un grand nombre de produits chimiques tout en se substituant à l'expérimentation animale. Après avoir sélectionné un certain nombre de modèles *in vitro* potentiellement intéressants, ceux-ci ont été validés en comparant les résultats obtenus avec des produits dits de référence dont la toxicité est connue, aux données provenant des modèles animaux avec les mêmes produits. Le caractère prédictif des modèles *in vitro* en terme de toxicité aiguë a ainsi pu être établi avec pour objectif de donner lieu à l'établissement de recommandations dans l'évaluation de la toxicité de tout produit chimique et dans la prédiction de tout risque toxique pour l'Homme.
- (13) Le développement cérébral: à l'échelon cellulaire, le développement cérébral implique une succession d'événements cellulaires qui commence dès la 3^e semaine de grossesse. Le développement cellulaire du système nerveux commence avec la neurogenèse qui est une phase de multiplication cellulaire intense à partir de cellules souches. Ces cellules vont ensuite migrer de la zone de division vers leur emplacement définitif où, dans une 3^e phase, elles se différencieront en neurones. Commence alors la synaptogenèse qui est la phase de

développement des prolongements axoniques et dendritiques qui vont permettre la mise en contact des neurones entre eux et la structuration des réseaux neuronaux. Le développement cérébral se poursuivra alors tout au long de la vie de l'individu avec l'élaboration de nouvelles connexions neuronales sous l'influence des stimulations perçues dans l'environnement, mais également avec le remaniement incessant des connexions existantes dans un phénomène connu sous le terme de plasticité synaptique. Ce dernier processus vise à permettre d'adapter les réseaux de neurones existants au traitement de l'information qui leur échoie au travers des stimulations reçues par ces réseaux. Toute perturbation de l'environnement perçue par le cerveau peut donc se traduire par des modifications de la plasticité synaptique avec à terme des variations anormales ou non dans les fonctions comportementales et/ou psychologiques que supportent ces réseaux.

- (14) Les cellules souches : ce sont des cellules qui sont capables de se diviser à l'identique de manière continue dans le temps et qui sont à l'origine de cellules hautement différenciées comme les cellules nerveuses, les cellules musculaires ou les cellules hématopoïétiques sous l'action de stimuli de différenciation. Il existe deux grands groupes de cellules souches : les cellules souches embryonnaires qui sont du plus grand intérêt du fait de leur capacité à donner naissance à n'importe quel type cellulaire, et les cellules souches adultes qui ont été découvertes dans différents tissus adultes (système nerveux, système sanguin, muscle) qui peuvent générer de nouvelles cellules relevant de l'organe en question mais aussi d'autres types cellulaires. Si l'utilisation des cellules souches d'abord envisagée dans le cadre d'approches thérapeutiques pour faire du remplacement cellulaire, elles constituent des modèles d'intérêt pour évaluer le risque de toxicité développementale des produits chimiques.
- (15) Les animaux transgéniques : un animal transgénique est un animal dont le génome a été modifié par insertion d'ADN étranger de manière à ce que cet ADN puisse être transmis à sa descendance. Les rongeurs constituent le gros des animaux génétiquement modifiés, cette technique permettant de créer des modèles de pathologies humaines très utilisés en recherche. On trouve également des animaux transgéniques parmi des espèces domestiques (vache, chèvre, mouton, lapin) pour faire produire à l'animal *via* le lait des protéines d'intérêt à usage biologique ou thérapeutique.
- (16) Les polybromodiphényléthers (PBDE) : à l'image des polychlorobiphényles, les PBDE constituent une famille de 209 composés chimiques qui diffèrent les uns des autres par le nombre et la position des atomes de brome présents sur la molécule. Ils ont des propriétés ignifugeantes et sont présents dans les matériaux de construction et les matières plastiques. Comme ils ne sont pas chimiquement liés aux molécules constitutives de ces matériaux, les PBDE sont relargués dans l'air et contaminent tous les niveaux de l'environnement. On les retrouve ainsi dans l'air intérieur, l'alimentation et le lait maternel. Les similitudes qui existent entre la structure des PCB et celle des PBDE ainsi que la

connaissance des propriétés toxiques des PCB posent des questions quant à la toxicité des composés polybromés pour la santé humaine, en particulier pour le jeune exposé au cours de la période précoce du développement. Ces composés sont ainsi considérés comme des polluants dont le risque est émergent et font à l'heure actuelle l'objet de nombreuses études de toxicologie.

- (17) La fonction thyroïdienne : la thyroïde est une glande située à la base du cou qui sécrète deux hormones comportant plusieurs atomes d'iode : la triiodothyronine (T₃) et la tétraiodothyronine (T₄). Chez l'adulte, ces hormones participent à la régulation du métabolisme général de l'organisme tandis que chez le jeune, elles jouent un rôle fondamental dans la morphogenèse cérébrale au cours du premier trimestre de la grossesse. Au cours de cette période, le fœtus est totalement dépendant de l'axe thyroïdien de sa mère, sa propre glande n'étant pas fonctionnelle. Il est donc évident que toute perturbation de la sécrétion de ces hormones sous l'effet par exemple des PBDE agissant comme perturbateurs endocriniens est à même de se traduire par des perturbations du développement cérébral avec pour conséquence des troubles du comportement.

Publications analysées

- Bal-Price AK, Hogberg HT, Buzanska L et al.** *In vitro* developmental neurotoxicity (DNT) testing: relevant models and endpoints. *Neurotoxicology*. 2010 ; 31(5):545-54. Sous presse en 2009.
- Schreiber T, Gassmann K, Götz C et al.** Polybrominated diphenyl ethers induce developmental neurotoxicity in a human *in vitro* model: evidence for endocrine disruption. *Environ. Health Perspect*. 2010, 118(4):572-8.
- Zurich MG, Monnet-Tschudi F.** Contribution of *in vitro* neurotoxicology studies to the elucidation of neurodegenerative processes. *Brain Res. Bull*. 2009 ; 80(4-5):211-6.

Publications de référence

- Brown RC, Lockwood AH, Sonawane BR.** Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors. *Environ. Health Perspect*. 2005 ; 113(9):1250-6.
- Cory-Slechta DA, Weiss B, Cranmer J.** The environmental etiologies of neurobehavioral deficits and disorders: weaving complex outcomes and risk modifiers into the equation. *Neurotoxicology*. 2008 ; 29(5):759-60.
- Hartung T.** Toxicology for the twenty-first century. *Nature*. 2009 ; 460(7252):208-12.
- Hartung T, Rovida C.** Chemical regulators have overreached. *Nature*. 2009 ; 460(7259):1080-81.
- Hogberg HT, Kinsner-Ovaskainen A, Hartung T et al.** Gene expression as a sensitive endpoint to evaluate cell differentiation and maturation of the developing central nervous system in primary cultures of rat cerebellar granule cells (CGCs) exposed to pesticides. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2009 ; 235(3):268-86.

Leist M, Hartung T, Nicotera P. The dawning of a new age of toxicology. *Altex*. 2008; 25(2):103-14.

Merlot C. Computational toxicology--a tool for early safety evaluation. *Drug Discov. Today*. 2010; 15(1-2):16-22.

Simon-Hettich B, Rothfuss A, Steger-Hartmann T. Use of computer-assisted prediction of toxic effects of chemical substances. *Toxicology*. 2006; 224(1-2):156-62.

Van Vliet E, Morath S, Eskes C et al. A novel *in vitro* metabolomics approach for neurotoxicity testing, proof of principle for methyl mercury chloride and caffeine. *Neurotoxicology*. 2008; 29(1):1-12.

Breier JM, Gassmann K, Kayser R et al. Neural progenitor cells as models for high-throughput screens of developmental neurotoxicity: state of the science. *Neurotoxicol Teratol*. 2010; 32(1):4-15.

Cet article est centré sur la description de modèles de cultures cellulaires mettant en jeu des cellules souches humaines ou murines, ou des progéniteurs neuronaux. Bien que très complet dans la présentation de ces modèles cellulaires et de leur utilisation potentielle en neurotoxicologie développementale, cet article n'a pas été retenu parce qu'il est redondant par certains aspects avec l'un des articles qui est analysé dans la note (Bal-Price et al., 2010).

Revue de la littérature

AcuteTox - Research project for alternative testing. 2005 à 2010. <http://www.acutetox.eu/>.

Gustafsson H, Runesson J, Lundqvist J et al. Neurofunctional endpoints assessed in human neuroblastoma SH-SY5Y cells for estimation of acute systemic toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2010; 245(2):191-202.

Schaafsma G, Kroese ED, Tielemans ELJP et al. REACH, non-testing approaches and the urgent need for a change in mind set. *Regul. Toxicol. Pharmacol*. 2009; 53(1):70-80.

Van Hemmen JJ, Marquart H. Reach and the obligations of the chemical industry. *Occup. Environ. Med.*, 2009, 66(8) : 561-568.

Van Hemmen JJ. Reach and the obligations of the chemical industry. *Occup. Environ. Med.* 2009; 66(8):560-8.

Williams ES, Panko J, Paustenbach DJ. The European Union's REACH regulation: a review of its history and requirements. *Crit. Rev. Toxicol*. 2009; 39(7):553-75.

Mots clés utilisés pour la recherche bibliographique

Brain toxicity, Cell culture, Developmental neurotoxicity, *In vitro* models, Neurodegeneration, Neurotoxicology.

Publications non sélectionnées

Andersen ME, Krewski D. Toxicity testing in the 21st century: bringing the vision to life. *Toxicol. Sci*. 2009; 107(2):324-30.

*Au-delà de l'utilisation des modèles de cultures cellulaires en toxicologie comme alternative à l'expérimentation animale, cette publication présente un panorama des éléments de réflexion ainsi que des ressources pouvant être mises en œuvre (modèles *in vitro*, méthodes de type « omique », outils de bioinformatique...) pour aboutir à la définition de nouvelles approches en toxicologie dans le but de cerner avec plus d'efficacité et de précision le risque toxique pour l'Homme de l'exposition aux substances chimiques. Comme l'ont indiqué les auteurs, ce manuscrit s'inscrit donc dans une logique visant à structurer et fédérer les ressources pour adapter les systèmes d'investigation en toxicologie. Cet article aurait donc pu faire partie des documents analysés dans cette note, mais son caractère trop généraliste par rapport au problème plus spécifique de la neurotoxicologie fait qu'il n'a pas été retenu.*