



Programme - Posters

Congrès de la SPTC Société de Pharmaco-Toxicologie Cellulaire

**"TOXICOLOGIE PREDICTIVE :
LES VOIES DU FUTUR"**

18 et 19 mai 2010

Université Paris Diderot
Amphithéâtre Buffon
15, rue Hélène Brion 75013 Paris
Plan d'accès : <http://www.univ-paris-diderot.fr>



Un des grands enjeux de santé publique est la prévention des éventuels effets néfastes liés à une exposition à un ou plusieurs agents chimiques, physiques ou biologiques présents dans notre environnement, domestique ou professionnel. C'est aussi une meilleure évaluation des risques liés à l'emploi des produits de santé. La performance et la prédictivité des études de toxicologie sont directement liées à l'association de méthodes complémentaires alternatives et d'expérimentations animales (obtenir les données chez plusieurs espèces avec des modèles différents, *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*). Malgré des efforts importants récents, l'évaluation toxicologique reste perfectible.

Dans ce congrès seront abordés les progrès récents à la fois scientifiques et technologiques autour de la « toxicologie prédictive ». Quatre grands thèmes

seront abordés : Modèles cellulaires et organes, Les « OMICS », Modélisation in silico et les nouvelles technologies (imagerie, puces cellulaires, haut débit).

Renseignements :

Christiane Hecquet

Conseil Scientifique

**Robert Barouki
Martine Clauw
Isabelle Fabre
Pierre-Jacques Ferret
André Guillouzo
Céline Laperdrix
Francelyne Marano
Marc Pallardy**

Comité d'Organisation

**Raymonde Guillot
Christiane Hecquet
Francelyne Marano
Marc Pallardy**

Avec l'aide de

**Laboratoires pierre Fabre
Yves Rocher**

Mardi 18 Mai 2010

Introduction :

Marc Pallardy, Président de la SPTC

Conférence plénière :

Toxicologie prédictive : intégration dans le développement du médicament.

Philippe Detilleux, Sanofi-Aventis Alfortville

Modèles cellulaires et organes

Modérateurs : Francelyne Marano et André Guillouzo

Cellules souches, obtention, culture et applications.

Ludovic Vallier, Université de Cambridge, Royaume Uni

Cellules HepaRG: de l'hépatoblaste à l'hépatocyte mature.

Christiane Guillouzo, INSERM, Rennes

L'intérêt des organes artificiels en toxicologie.

Cécile Legallais, Université de Compiègne

Conférence plénière :

Les bases chimiques de la toxicologie prédictive.

Daniel Mansuy, Université Paris-Descartes

Modélisation *in silico*
Modérateurs: Robert Barouki et Isabelle Fabre

Modélisation en toxicocinétique
Alexandre Péry, INERIS

Approches toxico-prédictives *in silico*.
*Philippe Manivet, INSERM/UEVE 829, CHU Lariboisière ,
BioQuanta, Paris*

OMICS
Modérateurs : Marc Pallardy et Pierre-Jacques Ferret

Protéomique appliquée à la toxicologie prédictive.
Thierry Rabilloud, CEA Grenoble

Mercredi 19 Mai 2010

Toxicogénomique et médicaments.
Catherine SPIRE, Servier

Toxicogénomique et polluants environnementaux.
Xavier Coumoul, Inserm, Université Paris Descartes

Métabonomique en toxicologie
Christophe Junot, CEA Saclay

Résumés des Posters

Nouvelles technologies
Modérateurs : Martine Clauw et Céline Laperdrix

Imagerie du vivant par spectrographie de masse en toxicologie.
Olivier Laprévote, Université Paris-Descartes

Imagerie du petit animal, un outil pour la toxicologie prédictive.
Alain Le Pape, CNRS, Orléans

Microsystèmes et analyse d'images automatisée.
Rémi Le Guevel, INSERM, Rennes

Remise du prix I. Chouroulinkov: Prix du meilleur poster

Cellules souches, obtention, culture et applications.

Ludovic Vallier

Human pluripotent stem cells can be generated from embryos at the blastocyst stage (human Embryonic stem Cells or hESCs) or from reprogrammed somatic cells (human Induced Pluripotent Stem Cells or iPSCs). These cells combine the property to grow indefinitely in vitro and the capacity to differentiate into a broad number of cell types. Thus, human pluripotent cells represent a unique opportunity for regenerative medicine since they could enable the production of infinite quantity of cell types with a clinical interest such as liver and pancreatic cells. Importantly, iPSCs could allow the production of patient specific cell types which are fully immuno-compatible with the original donor thereby avoiding the use of immune suppressive treatment during cell based therapy. In addition, iPSCs can be generated from somatic cells isolated from patients with diverse diseases. Then, the resulting "diseased" iPSCs can be differentiated into the cell type targeted by the disease and thus provide an in vitro model useful for basic studies and drug screening.

Our group has established a solid experience with iPSCs by deriving more than 200 lines from 20 patients suffering from diverse diseases. For that, we have developed a robust method of reprogramming allowing the derivation of iPSCs from 8 of 10 patients independently of their age or sex. In addition, we have developed fully defined culture systems to differentiate human pluripotent stem cells into pancreatic and hepatic progenitors. The resulting cells display functional characteristics specific of their in vivo counterparts such as glucose response and Albumin secretion. More importantly, this approach can be used with iPSCs derived from patient with liver metabolic diseases to develop in vitro models allowing large scale experiments impossible to perform with primary culture or biopsy material. These results represent a first step to deliver the clinical benefit of human pluripotent stem cells.

L'intérêt des organes (bio)artificiels en toxicologie prédictive

*E. Leclerc, J.M. Prot, L. Choucha, R. Baudoin, M. Dufresne, A. Gautier, B. Carpentier
C. Legallais*

*UMR CNRS 6600 Biomécanique et Bioingénierie
Université de Technologie de Compiègne*

Les organes artificiels sont développés dans le domaine des Technologies pour la Santé avec un objectif de suppléance d'organe, pour les patients en attente de transplantation ou ne pouvant bénéficier d'un tel traitement. Ainsi, le rein artificiel, appelé hémodialyse, est couramment utilisé en clinique depuis 40 ans. Les recherches actuelles, grâce aux progrès de l'ingénierie tissulaire, se concentrent en particulier sur le développement d'organes bio-artificiels, équipés de cellules, visant à reproduire l'ensemble des fonctions d'un organe.

En toxicologie prédictive *in vitro*, on cherche également à mimer au mieux les fonctions d'un tissu, d'un organe ou d'un organisme entier, dans un objectif différent : décrire les effets d'un xénobiotique ou de ses métabolites. Il apparaît essentiel de proposer des méthodes de culture pertinentes qui se rapprochent de l'*in vivo*. En effet, les modèles de cultures cellulaires « classique » en deux dimensions peuvent paraître limités, car ils ne reflètent pas l'agencement tridimensionnel des cellules dans un tissu ou un organe.

L'adaptation des organes artificiels à la toxicologie permet d'envisager de pallier ces limites, mais aussi de suivre en temps réel, par des méthodes sophistiquées de perfusion, les transferts de molécules, entre différents compartiments cellulaires. On peut ainsi accéder à une vision dynamique intégrée du xénobiotique et de ses métabolites, et éventuellement de leur accumulation dans certains types cellulaires ou compartiments.

On peut adapter ces organes bio-artificiels à différentes échelles : d'une part, à celle de bioréacteurs contenant quelques dizaines de millilitres de fluide de perfusion, et d'autre part, à celles de puces à cellules, exploitant les progrès récents dans le domaine des micro et nanotechnologies. En effet, la topographie de surface introduite par les techniques de micro-fabrication permet une culture aisée des cellules dans les trois dimensions. Différentes équipes ont ainsi pu démontrer l'intérêt des structures micro-fluidiques pour maintenir l'état de différenciation de plusieurs types cellulaires confortant l'impact de l'organisation cellulaire dans des micro-canaux. Ces dispositifs de culture peuvent être agencés de façon à aboutir au concept d' « homme sur puce ». Couplés à d'autres types d'analyse, comme la modélisation pharmaco-cinétique ou des études « omics », ils offrent un réel potentiel qui pourra déboucher sur des méthodes validées.

Dans cet exposé, nous ferons donc le point sur l'avancée des travaux sur ces nouveaux types d'organes (bio)artificiels, déjà offerts en tant qu'outils de toxicologie prédictive, ou potentiellement transposables.

LES BASES CHIMIQUES DE LA TOXICOLOGIE PREDICTIVE

Daniel MANSUY

UMR 8601, Université Paris Descartes, Centre des Saints-Pères

Pourra-t-on un jour prévoir la toxicité d'un composé à partir de sa structure moléculaire ? Ce problème de la corrélation entre structure et toxicité est tout à fait central dans les domaines de la toxicologie prédictive et de l'élaboration de nouvelles molécules par les industries chimiques, pharmaceutiques et agroalimentaires. Il se pose avec une acuité toute particulière après les sorties récentes du règlement européen REACH sur les substances chimiques (2007), et de la directive de la FDA de 2008 sur l'évaluation toxicologique de certains métabolites de médicaments. En fait, on peut distinguer deux grandes catégories de mécanismes par lesquels un xénobiotique peut devenir toxique pour un être vivant : (1) en établissant une liaison forte mais réversible avec une ou plusieurs cibles biologiques importantes, ou (2) en conduisant à des métabolites réactifs capables de modifier de façon irréversible certaines cibles biologiques. Les toxicités dues à des métabolites réactifs sont les plus fréquentes et les moins difficiles à prévoir dans la mesure où elles dépendent de la réactivité chimique intrinsèque du xénobiotique et de l'existence, dans sa structure, de fonctions activables métaboliquement en espèces agressives pour les milieux biologiques. L'exposé portera donc sur la prévision de ce type de toxicités en prenant en compte les trois éléments qui vont conduire à une modification irréversible de cibles biologiques : la présence, dans la molécule de départ, de fonctions chimiques activables et donc protoxiques potentielles, la transformation effective de ces fonctions en métabolites réactifs par les enzymes du métabolisme des xénobiotiques, et la capacité de ces métabolites réactifs à modifier de façon irréversible un (ou des) composant(s) cellulaire(s). L'état de l'art de nos connaissances à propos de ces trois éléments, qui sont déterminants pour les étapes précoces du développement d'une toxicité, et pour une prévision de cette toxicité à partir de la structure du xénobiotique, sera présenté. Enfin, pour terminer, des résultats très récents concernant une classe de métabolites réactifs peu reconnus jusqu'alors, seront décrits.

Modélisation en toxicocinétique

Alexandre Péry et Céline Brochot

INERIS, Unité « Modèles pour l'écotoxicologie et la toxicologie » (METO)

La réponse toxicologique comprend deux parties complémentaires, la toxicocinétique qui rend compte de la distribution d'un composé et de ses métabolites dans l'organisme au cours du temps, et la toxicodynamique qui rend compte des effets de ces substances au niveau de leurs cibles biologiques. La toxicocinétique est généralement étudiée par des expérimentations chez l'animal. Cependant, grâce aux développements récents de méthodologies *in vitro* et de méthodes bioinformatiques, une part de l'information toxicocinétique peut désormais être obtenue par des approches alternatives à l'expérimentation animale, en particulier s'agissant des coefficients de partage entre le sang et les différents organes, de la vitesse de franchissement d'une barrière biologique, et de la vitesse de métabolisme. Pour prédire la cinétique d'une substance, il reste cependant nécessaire d'intégrer l'ensemble de cette information dans un seul modèle à l'échelle de l'organisme. Dans le cadre des modèles PBPKs (Physiologically-Based Pharmacokinetics), cette intégration se réalise de façon quasi-automatique. En effet, ces modèles décrivent les processus de cinétique grâce à des paramètres ayant un sens biologique (volumes d'organes, flux sanguins) ou biochimique (taux de métabolisation, coefficients de partage). Il est donc possible de les calibrer à partir de connaissances biologiques déjà bien établies sur des populations ou sous-populations humaines et des résultats de test *in vitro* ou de méthodes *in silico*. Cette première calibration peut ensuite être améliorée en y intégrant des données non invasives qui peuvent être obtenues chez des volontaires humains (dosages d'échantillons de sang et d'urine). Il existe des outils statistiques bien adaptés, comme les techniques d'inférence bayésienne, pour y parvenir aisément. La modélisation PBPK présente d'autres avantages dans l'optique de bonifier les résultats des tests *in vitro*. Ainsi, les aspects systémiques des mélanges de substance ne peuvent être appréhendés uniquement par des études cellulaires de co-exposition. Celles-ci doivent alimenter un système de plusieurs modèles PBPKs imbriqués, qui est le seul capable de représenter les différences de distribution entre les substances qui donnent lieu à des interactions dissemblables selon les organes considérés. D'autre part, la modélisation PBPK peut permettre de mettre en relation l'information tirée des méthodes « omics », en particulier la métabonomique, avec les paramètres explicatifs de la toxicocinétique. Les modèles PBPKs constituent donc un outil essentiel pour accompagner les développements de méthodes alternatives dans un cadre d'évaluation des effets des substances chez l'homme.

Protéomique appliquée à la toxicologie prédictive

Thierry Rabilloud

iRTSV/LBBSI, UMR CNRS-CEA-UJF 5092
CEA-Grenoble, 17 rue des martyrs
38054 GRENOBLE CEDEX 9, France

Alors que les méthodes issues de la génomique sont de plus en plus utilisées en toxicologie, la protéomique reste très faiblement utilisée dans ce domaine. Son utilisation principale reste la recherche de biomarqueurs, alors que même dans ce domaine, son efficacité est loin d'être avérée. Cette faible utilisation contraste avec la valeur théorique des renseignements que pourrait apporter la protéomique en toxicologie. En effet, en s'intéressant à "l'ouvrier moléculaire" de la cellule, l'analyse protéomique devrait être capable de mettre en évidence une grande variété d'effets des toxiques, depuis des changements dans l'expression des protéines jusqu'à des greffages moléculaires des toxiques directement sur les protéines.

Cependant, il serait faux de croire que l'analyse protéomique n'est pas et n'a jamais été appliquée en toxicologie. Des exemples existent, mais ils restent rares et sont anciens, ce qui dénote une relative incompatibilité entre les contraintes s'appliquant à la toxicologie et celles s'appliquant à l'analyse protéomique.

Ce point crucial sera illustré en décrivant les différentes méthodes utilisées en analyse protéomique (gel, "à la tronçonneuse" et SRM), leurs avantages et leurs inconvénients, en particulier sur le plan de la reproductibilité et de l'analyse quantitative; puis en comparant cet état de l'art aux contraintes de l'analyse toxicologique. En plus d'expliquer la faiblesse actuelle de l'analyse protéomique en toxicologie, cet exercice permettra aussi d'illustrer certaines pistes qui pourraient permettre un renouveau de l'utilisation de l'analyse protéomique dans le domaine de la toxicologie.

Application de la toxicogénomique dans le développement pré-clinique des médicaments

Catherine SPIRE – Biologie SERVIER, Centre de sécurité du médicament, France.

La toxicogénomique a pour but d'évaluer les variations de l'expression des gènes dans un tissu cible ou un modèle cellulaire en réponse à un xénobiotique et de les relier à ses effets toxicologiques.

Les technologies d'analyse de l'expression de milliers de gènes, grâce aux puces à ADN (microarrays pangénomiques), ou de quelques dizaines/centaines de gènes ciblés, grâce à la PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR), sont maintenant couramment appliquées dans l'industrie pharmaceutique à tous les niveaux de développement d'un nouveau médicament : (i) pour la sélection de molécules d'intérêts (criblage, sélection des meilleurs candidats), (ii) pour la détection précoce de signaux toxicologiques prédictifs, (iii) pour une approche mécanistique dans des études dédiées, afin de mieux documenter un phénomène toxique et sa pertinence pour l'homme. Dans les études de toxicologie réalisées chez l'animal, ces techniques sont associées aux outils conventionnels (biochimie clinique, histomorphologie, cinétique ...), ce qui permet d'élargir les connaissances sur les réseaux des signaux biologiques et toxiques impactés.

Après une description des 2 technologies de puce à ADN et de RT-qPCR, leur application en toxicologie sera étayée par quelques exemples sur la détection du potentiel hépatotoxique d'une molécule. L'hépatotoxicité reste encore mal prédite par les études conventionnelles de toxicité sur l'animal et constitue le principal effet indésirable responsable du retrait du marché des médicaments.

Toxicogénomique et polluants environnementaux

Xavier COUMOUL, INSERM UMR-S 747, Université Paris-Descartes

Les populations de pays industrialisés et celles de pays en voie de développement sont communément exposées à divers polluants environnementaux. Les « Polluants Organiques Persistants » (POP) sont caractérisés par leur longue demi-vie due à un métabolisme très lent et à leur stockage dans les graisses. La toxicité de ces composés est diverse et dépend de plusieurs facteurs comme la nature du polluant et son mode d'action. Le rôle de nombreux polluants dans l'initiation et la promotion des cancers a été démontré. Cependant, il existe peu d'études sur la relation entre la progression tumorale (formation des métastases) et l'exposition à des polluants environnementaux. De même, le mécanisme d'autres toxicités comme la tératogenèse ou la toxicité cutanée demeurent insuffisamment compris.

La dioxine, cancérigène de type I selon les critères de l'IARC, et ligand du récepteur Ah (AhR) est un POP. La voie de signalisation du AhR a été très largement décrite dans le cadre de la régulation de l'expression des enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX). Des études récentes de génomique fonctionnelle ont montré que ce récepteur régulait l'expression d'autres gènes que les EMX : au sein de l'équipe du Pr Barouki, nous avons montré par ces techniques que la dioxine altère l'expression de gènes de la plasticité cellulaire et active la mobilité de cellules cancéreuses en culture. Cette observation nouvelle nous a conduit à faire l'hypothèse que les POPs pourraient avoir un rôle potentiel dans la progression tumorale, et notamment dans l'apparition de métastases. A la suite de ces observations de génomique fonctionnelle, nous avons commencé l'étude de la régulation des gènes caractérisés et de leur implication dans les phénomènes de plasticité. Nous développerons ici l'exemple du gène HEF1 (Human Enhancer of Filamentation 1) qui a depuis été identifié comme marqueur métastatique chez l'Homme.

Compte tenu des filiations entre migration cellulaire et développement, ces techniques ont également été utilisées dans le cadre de projets centrés sur le rôle endogène du AhR chez deux modèles animaux (cervelet de souris, neurones de nématodes). Des résultats préliminaires seront présentés.

L'analyse métabolomique pour la toxicologie: état des lieux et perspectives

Christophe Junot

Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments, DSV/iBiTec-S/SPI, Bâtiment 136, CEA/Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette cedex.
E-mail: christophe.junot@cea.fr

Apparu à la fin des années 1990, le concept de «métabolome» désigne l'ensemble des métabolites présents dans un milieu biologique. Les métabolites peuvent être définis comme des molécules organiques de petites tailles impliquées dans des réactions enzymatiques. Les terminologies de métabolites "primaires" et "secondaires" sont souvent utilisées dans les manuels. Les premiers regroupent des substances communes à toutes les cellules biologiques des règnes animaux et végétaux et impliquées dans le métabolisme énergétique, tels que certains sucres, les acides aminés ou les acides tricarboxyliques du cycle de Krebs. Les seconds sont produits en dehors des réactions enzymatiques qui sont strictement nécessaires à la survie et ils sont spécifique d'un règne voire d'une espèce. En fait, la définition la plus générale nous amène considérer comme métabolite toute substance qui ne provient pas directement de l'expression des gènes.

L'analyse métabolomique constitue une approche globale analogue à celle de la protéomique ou de la transcriptomique et qui s'inscrit en complément de celles-ci. Son objectif est de caractériser des biomarqueurs en comparant des empreintes métaboliques qui contiennent plusieurs milliers de signaux et qui sont caractéristiques d'états biologiques donnés. L'étude de profils métaboliques par des techniques analytiques telles que la résonance magnétique nucléaire ou la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse est en fait déjà connue depuis de nombreuses années, mais leurs récents perfectionnements ainsi que leur association à des outils informatiques, statistiques et chimiométriques permettent aujourd'hui d'étendre les possibilités et d'accélérer les processus de découverte et d'identification de biomarqueurs de toxicité. Ainsi, l'analyse métabolomique permet d'aboutir à une meilleure compréhension des systèmes biologiques en mettant en évidence des interrelations métaboliques qui n'auraient pas pu être détectées avec des approches basées sur des raisonnements biochimiques traditionnels.

Il s'agit ici d'expliquer comment se déroule une analyse métabolomique et de faire le point sur les avancées technologiques récentes qui ont été réalisées en la matière. Des exemples d'application dans le domaine du biomarquage et de l'étude de mécanismes de toxicité seront également commentés et nous discuterons enfin des principales limitations qui restent à surmonter pour que cette approche puisse fournir des données exploitables par les biologistes et les médecins.

1 La diminution des capacités de phagocytose bactérienne dépendante de Nod1 est associée à une susceptibilité accrue aux infections urinaires ascendantes chez les patients transplantés rénaux traités par la cyclosporine

Emilie Tourneur¹, Sanae Ben Mkaddem¹, Cécilia Chassin¹, Meryem Aloulou², Jean M Goujon³, Alexandre Hertig⁴, Nacera Ouali⁴, Sophie Vimont⁵, Renato Monteiro², Eric Rondeau⁴, Carole Elbim¹, Catherine Werts⁶, Alain Vandewalle¹

¹INSERM U773 et ²INSERM U699 - Université Paris 7-Denis Diderot, site Bichat, BP 416, F-75018, Paris, France. ³Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers-Université de Poitiers, F-86021 Poitiers, France, ⁴ Service Urgences Néphrologiques et Transplantation Rénale et ⁵Service de Bactériologie, Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine, F-75970, Paris, et ⁶Institut Pasteur, G5 Biologie et Génétique des parois bactériennes - INSERM Groupe Avenir, 75724 Paris Cedex 15, France.

Les infections du tractus urinaire (ITU) et pyélonéphrites (PN), principalement dues aux *Escherichia coli* uropathogènes (UPEC), sont les premières causes de complications infectieuses chez les patients transplantés rénaux sous traitement immunosuppresseur. Les mécanismes impliqués dans cette plus grande susceptibilité aux infections par rapport à la population normale ne sont pas connus. L'analyse des leucocytes de patients transplantés rénaux ayant présenté des épisodes d'ITU et/ou de PN a mis en évidence une diminution singulière de l'expression de la protéine cytosolique Nod1 qui reconnaît majoritairement les bactéries invasives Gram-négatif. À l'inverse des agonistes des récepteurs Toll-like (TLR) et du muramyldipeptide (MDP, reconnu par Nod2), un agoniste spécifique de Nod1, le FK156, n'active pas les principales fonctions des polynucléaires neutrophiles (PMN) chez les patients transplantés rénaux. Ces résultats suggèrent que les fonctions phagocytaires des PMN dépendantes de Nod1 sont altérées chez les patients transplantés. Des études réalisées sur un modèle expérimental d'ITU ont montré que les reins de souris *Nod1*^{-/-} sont plus sensibles que les sauvages (WT) 24h après l'inoculation transurétrale d'UPEC. Les macrophages dérivés de souris *Nod1*^{-/-}, contrairement à ceux des WT et *Nod2*^{-/-}, présentent un défaut d'activation de la GTPase Rac1, de la phosphorylation de la PI3K, et de la production de formes réactives de l'oxygène (FRO). La cyclosporine A (CsA), un agent immunosuppresseur largement utilisé pour la prévention des rejets de greffe, inhibe aussi l'activité de Rac1, la production de FRO et la phagocytose des UPEC. L'administration de CsA à des souris WT induit une inhibition de l'expression rénale de la protéine Nod1 et aggrave la colonisation rénale des UPEC, qui est prévenu par l'administration de FK156. Ces données suggèrent que l'inhibition de Nod1, jouant un rôle clé dans le contrôle de la phagocytose, rend compte de la grande susceptibilité des patients transplantés rénaux aux infections urinaires.

Ce travail a bénéficié d'un contrat de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR-08-MIEN-030, à A.V.)

La gp96 et la NAD(P)H oxydase 4 génératrice de formes réactives de l'oxygène jouent un rôle clé dans l'induction de l'apoptose dépendante du récepteur Toll-like 4 au cours de l'ischémie-reperfusion rénale

S. Ben Mkaddem¹, E Pedruzzi¹, C Werts², N Coant¹, M Bens¹, F Cluzeaud¹, JM Goujon³, E Ogier-Denis¹ et A Vandewalle¹

¹INSERM U773, Centre de Recherche Biomédicale Bichat-Beaujon CRB3 - Université Paris 7 - Denis Diderot, site Bichat, BP 416, F-75018, Paris, France, ²Institut Pasteur, G5 Biologie et Génétique des Parois Bactériennes, and groupe INSERM Avenir, 75724 Paris Cedex 15, France, et ³Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, Université de Poitiers, F-86021, Poitiers, France

L'ischémie-reperfusion (I/R) induit une réaction inflammatoire et des lésions tissulaires résultant de l'activation bactérienne des voies de signalisation du système immunitaire. Le récepteur Toll-like 4 (TLR4) activé par des protéines endogènes (dénommées DAMP pour damage-associated pattern molecule) sécrétées, joue un rôle clé dans l'induction de l'apoptose au cours de l'I/R. Cependant les voies de signalisation responsables de l'apoptose cellulaire au cours de l'I/R restent mal connues. Dans ce travail nous montrons que TLR4 contrôle, par le biais de la protéine adaptatrice MyD88, l'activation d'une voie pro-apoptotique incluant TRAF2, ASK1, et des MAP kinases JNK et p38 dans les reins soumis à une I/R et dans de cultures primaires de cellules tubulaires rénales (RTECs) soumises à une hypoxie. Nous montrons aussi que l'hypoxie stimule l'expression de la protéine de choc thermique gp96 associée au réticulum endoplasmique, qui co-immunoprécipite avec TLR4, et que l'extinction de la gp96 par interférence ARN prévient l'activation de l'apoptose des RTECs soumises à une hypoxie. La NAD(P)H oxydase 4 (NOX4) productrice de formes réactives de l'oxygène (FRO) a été montré interagir avec TLR4 et être nécessaire à l'activation de la production de FRO. L'I/R rénale induit une surexpression de NOX4 (principalement une isoforme de 28 kDa) qui co-immunoprécipite avec TLR4 mais pas avec la gp96 dans les RTECs invalidées pour TLR4. De plus, l'inactivation de NOX4 inhibe l'activation de ASK1 et de JNK et de la p38 induites par l'hypoxie conduisant à une inhibition de la production des FRO et de l'apoptose dans les RTECs exprimant TLR4. L'ensemble de ces résultats démontrent que, conjointement à l'activation de la p38, l'interaction entre la gp96 et TLR4 est nécessaire à l'activation de la signalisation pro-apoptotique ASK1/JNK et suggère que l'isoforme 28kDa de NOX4 joue un rôle clé dans l'activation de l'apoptose dépendante de TLR4 au cours de l'I/R rénale.

Ben Mkadem et coll., Cell Death and Differ, 2010, sous presse

Ce travail a bénéficié d'un contrat de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR-08-MIE-N-030, à A.V.).

Rôle potentiel des Dual oxydases (DUOX1-2) comme source des formes réactives de l'oxygène dans un modèle cellulaire de la mucoviscidose.

N. PONGNIMITPRASERT^{1,2}, C. BABIN-CHEVAYE¹, M. FAY¹, M. BERNARD², C. DUPUY³, J. EI BENNA¹, M.A. GOUGEROT-POCIDALO¹.et F. BRAUT-BOUCHER¹,

¹INSERM, U773, Centre de Recherche Biomédicale Bichat Beaujon CRB3, Université Paris 7 Denis Diderot, site Bichat, 16 rue Henri Huchard, 75018 Paris France.

²Laboratoire de Biochimie Générale, U.F.R. des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université René Descartes Paris 5

³CNRS, FRE 2939, Villejuif, France

La mucoviscidose est une maladie génétique létale due à une mutation sur un gène situé sur le chromosome 7, codant pour le « cystic fibrosis trans regulator »(CFTR) qui fonctionne comme un canal chlore de la membrane épithéliale. La production des formes réactives de l'oxygène (FRO) associée à une inflammation précoce contribuerait à la pathogenèse de la maladie. Les FRO peuvent avoir différentes origines mais le rôle des NADPH oxydases est essentiel. La première NADPH oxydase a été identifiée dans le phagocyte, et à ce jour de nombreux homologues des NOX ont été identifiés dans différents tissus : les poumons expriment plus spécifiquement les DUOX 1-2 qui furent d'abord découvertes dans les cellules thyroïdiennes.

Dans ce travail nous étudions les DUOXs qui pourraient être source de FRO et susceptibles de jouer un rôle dans le déclenchement de la réaction inflammatoire précoce dans la mucoviscidose.

Des cellules épithéliales bronchiques déficitaires en CFTR (lignée IB3-1) comparées à des cellules témoins (lignée S9) sont soumises à des variations ioniques (Cl⁻) du milieu. Les cellules pathologiques montrent une production augmentée des FRO, une déplétion des thiols, et une entrée en apoptose plus rapide dans un environnement hypertonique. Le pré- traitement par le DPI, inhibiteur des NADPH oxydases, inhibe ces différents paramètres, ce qui suggère une implication de ces enzymes dans le stress oxydant ; de plus, nous confirmons l'augmentation de la production des cytokines IL6 et IL8. Par immuno blotting nous montrons que l'expression des Dual oxydases est plus importante dans les cellules déficitaires en CFTR que dans les cellules témoins.

Ces résultats concordent avec un état pré-inflammatoire sans infection préalable en relation avec le stress oxydant ; néanmoins , la fonction exacte des DUOXs dans l'inflammation et/ou les capacités de défense des cellules mucoviscidoseuses reste à explorer et pourrait représenter une cible thérapeutique potentielle.

4 Toxicité digestive comparée d'une mycotoxine (Deoxynivalenol ou DON) et de deux dérivés acétylés co-contaminants des céréales (3acétyl-DON et 15 acétyl-DON) par une approche *in vitro* et *ex-vivo*

Philippe Pinton², Joelma Luciola², Dima Tsybulskyy², Benjamin Joly¹, Joëlle Laffitte²,
Nathalie Bourges-Abella¹, Isabelle P. Oswald² and Martine Kolf-Clauw¹

1 Université de Toulouse, Ecole Nationale Vétérinaire, 23 chemin des Capelles, BP 87614
31300 Toulouse Cedex 3, France

2 Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie UR66, INRA, 180 chemin de Tournefeuille, BP93173,
31027 Toulouse Cedex 3, France

Le déoxynivalénol (DON) est un contaminant des céréales destinées à l'Homme et à l'alimentation animale, en pays tempéré. Le DON est présent avec d'autres fusariotoxines apparentées (cocontaminants), en particulier les dérivés acétylés 3aDON et 15 aDON. La protection du consommateur est fondée sur la caractérisation des effets biologiques du DON, mais ne prend pas en compte la présence des autres co-contaminants. La barrière digestive constitue une cible très sensible pour le DON ingéré via les aliments (Pinton et al. 2009), le porc représentant l'espèce animale la plus sensible et un modèle pertinent pour l'évaluation du risque chez l'homme. Ce travail a eu pour objectif de comparer les effets du DON et ses dérivés acétylés, sur la fonction de barrière digestive, en utilisant deux modèles différents.

Les effets du DON, du 3aDON et du 15 aDON ont été comparés sur la lignée de cellules épithéliales intestinales porcine (IPEC-1). Une toxicité supérieure du 15aDON comparée à celle du DON et du 3aDON a été observée sur la base de la prolifération cellulaire, la résistance transépithéliale et la perméabilité paracellulaire au Dextran. Ces altérations ont été associées à une réduction de l'expression de deux protéines de jonctions serrées, les Claudines 3 et 4, ainsi qu'à une augmentation de la phosphorylation de p44/42 ERK, une Mitogen-activated protéine kinase décrite comme agissant sur la structure et la fonction des jonctions serrées.

Des explants jéjunaux de porcelets ont également été exposés pendant 4 heures à ces 3 mycotoxines (DON, 3aDON ou 15aDON) et l'histopathologie a été évaluée par un score morphologique et lésionnel (Kolf-Clauw et al. 2009). Les résultats ont confirmé la toxicité supérieure du 15 aDON par rapport au DON et 3aDON.

En conclusion, ces résultats soulignent l'intérêt de l'approche *ex vivo* et *in vitro* utilisée ici qui conduit à des résultats concordants et complémentaires.

Références

- Kolf-Clauw M, Castellote J, Joly B, Bourges-Abella N, Raymond-Letron I, Pinton P, Oswald IP. (2009) Development of a pig jejunal explant culture for studying the gastrointestinal toxicity of the mycotoxin deoxynivalenol: histopathological analysis. *Toxicol In Vitro*, **23**: 1580-4.
- Pinton P, Nougayrede JP, Del Rio JC, Moreno C, Marin DE, Ferrier L, Bracarense AP, Kolf-Clauw M, Oswald IP. (2009) The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. *Toxicol Appl Pharmacol*; **237**: 41-8.

L'induction de la protéine Son of Sevenless 1, activateur de Ras, par les polluants environnementaux régule la prolifération cellulaire

Stéphane Pierre, Anne-Sophie Bats, Aline Chevallier, Linh-Chi Bui, Ariane Ambolet-Camoit, Michèle Garlatti, Martine Aggerbeck, Robert Barouki, Xavier Coumoul

INSERM UMR-S 747 – Université Paris Descartes

Résumé

La dioxine (TCDD (2, 3, 7, 8-TetraChloroDibenzoDioxin)) est un important polluant environnemental, classée cancérigène chez l'homme. C'est également, le ligand qui à la plus forte affinité pour le Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR), et qui induit via ce récepteur, une grande variété de gènes dont les enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX). Ce polluant engendre une grande variété d'effets toxiques systémiques, telless que, la promotion cancéreuse et diverses altérations cellulaires qui modifie le cycle cellulaire et la prolifération cellulaire. Différentes études génomiques dans un modèle de cellule humaine ont montré que l'expression de Son of Sevenless 1 (SOS1), le principal médiateur de l'activation de Ras, est une des cibles de la dioxine. La régulation de SOS1 par le AhR et ces ligands, dont le promoteur n'avait pas encore été caractérisé, a donc été étudié dans la lignée d'hépatocarcinome humaine, HepG2. Nous avons trouvé que divers polluants environnementaux (ligands du AhR) augmentaient l'expression de SOS1 en induisant sa transcription. Des expériences d'Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) nous ont permis de démontrer que le AhR se liait directement au promoteur du gène SOS1 et activait sa transcription. De plus, nous avons montré qu'un traitement par la dioxine conduisait à une activation de Ras, sous sa forme Ras-GTP, une activation de ERK suivi d'une augmentation de la prolifération cellulaire. L'ensemble de ces effets sont médiés par SOS1 comme le montre les manipulations d'ARN interférents. Notre étude suggère ainsi que l'induction de SOS1 par la dioxine conduit à des effets cellulaires similaires de ceux décrit et bien caractérisés lorsqu'il y a des mutations oncogéniques de Ras.

6 INHIBITION PAR LA DIOXINE DE LA RÉPONSE P53 INDUITE PAR L'ÉTOPOSIDÉ VIA
LE MARQUEUR MÉTASTATIQUE AGR2 (ANTERIOR GRADIENT 2) DANS LA LIGNEE
D'HEPATOCARCINOME HUMAIN HEPG2.

Ariane Ambolet-Camoi, Linh Chi Bui, Stéphane Pierre, Aline Chevallier, Alexandre Marchand,
Xavier Coumoul, Michèle Garlati, Karine Andreau, Robert Barouki et Martine Aggerbeck.

Laboratoire INSERM UMR-S 747, 45 rue des Saints Pères, 75006 Paris

La dioxine ou TCDD (2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxin) est un polluant environnemental et un ligand du AhR (Aryl hydrocarbon Receptor), un facteur transcriptionnel qui intervient dans divers processus biologiques. Dans cette étude, nous montrons que la dioxine diminue l'activation de p53 (phosphorylation et acétylation) qui est induite par un composé génotoxique, l'étoposide dans la lignée HepG2 : nous avons mis en évidence un des mécanismes de cette interaction. En transfectant les cellules avec des siRNA, nous montrons que le marqueur métastatique AGR2 (Anterior Gradient-2) est impliqué dans cet effet. Les niveaux d'expression de l'ARNm et de la protéine AGR2 sont augmentés par la dioxine (6 fois et 4 fois respectivement) et cet effet nécessite le récepteur AhR. La demi-vie de l'ARNm de AGR2 n'est pas modifiée par le traitement de la dioxine. L'analyse *in silico* du promoteur du gène AGR2 permet d'identifier 3 éléments de réponse à la dioxine (XRE) potentiels dans 3,5kb du promoteur proximal. Dans les cellules HepG2, des transfections transitoires du gène rapporteur de la Gaussia luciférase sous le contrôle de différents fragments délétés ou mutés du promoteur de AGR2 indique que seul le XRE le plus proximal est actif. La liaison du AhR au promoteur de AGR2 est optimisée par le traitement de la dioxine. Ces résultats suggèrent que les ligands du AhR telle que la dioxine peuvent contribuer à la progression tumorale en diminuant l'activation de p53 (phosphorylation et acétylation) induite par des génotoxiques via l'augmentation du marqueur métastatique AGR2.

7 Liverbeads™ : un modèle pratique et pertinent pour l'étude *in vitro* de l'induction de gènes du métabolisme des xénobiotiques

Ihab Al Khansa, Olivier Blaneck, André Guillouzo and Rémi Bars

Bayer Cropscience, Toxicologie Recherche, F- 06903 Sophia-Antipolis, France (IAK, RB, OB), Inserm UMR 991, Foie, Métabolismes and Cancer, F- 35033 Rennes, France (IAK, AG) ; Université de Rennes 1, F- 35043 Rennes, France (IAK, AG).

Les Liverbeads™, hépatocytes de rat cryopréservés immobilisés dans de l'alginate, ont été évalués pour leur pertinence en tant que modèle de screening *in vitro* de l'induction de gènes du métabolisme des xénobiotiques (Cyps et Ugts). Ils ont été traités pendant 24, 48 ou 72 h avec des inducteurs de référence tels que la bêta-naphthoflavone (BNF), le phénobarbital (PB), la prégnenolone 16 α -carbonitrile (PCN) et l'acide clofibrrique (CLO). Les taux de transcrits des Cyp1a1, Cyp2b1, Cyp3a1, Cyp4a1, Ugt1a6 et Ugt2b1 ont été mesurés par la technique de RT-qPCR et les résultats ont été comparés à ceux obtenus *in vivo* à partir de foies de rats traités avec PB et PCN. Pour chaque inducteur, les profils d'induction de gènes obtenus avec les Liverbeads™ étaient concentration- et temps-dépendants. Plus précisément, les gènes les plus induits étaient Cyp1a1 par BNF, Cyp2b1 par PB, Cyp3a1 et Ugt2b1 par PCN et Cyp4a1 et Cyp2b1 par CLO. Des inductions moins fortes et plus tardives d'autres gènes ont également été observées avec chaque inducteur. Ainsi, Ugt1a6 et Cyp2b1 étaient induits par BNF, Cyp1a1, Cyp3a1 et Ugt2b1 par PB et Cyp3a1 par CLO. Les profils d'expression de gènes obtenus avec les Liverbeads™ correspondaient à ceux obtenus avec les mêmes inducteurs *in vivo* chez le rat et *in vitro* dans la littérature. Ces résultats conduisent à la conclusion que les Liverbeads™ représentent un modèle reproductible, d'utilisation aisée et applicable à des comparaisons inter-espèces pour l'étude *in vitro* de l'induction de gènes du métabolisme des xénobiotiques.

C. Rouas, H. Bensoussan, D. Suhard, C. Tessier, L. Grandcolas, M. Pallardy, Y. Gueguen

Depuis plusieurs années, l'uranium, métal lourd naturellement présent dans l'environnement, fait l'objet d'études dont le but est de mieux estimer ses effets biologiques. A l'échelle cellulaire, les techniques d'imagerie utilisées jusqu'à présent (MET, diffraction des rayons X) ont montré une précipitation intracellulaire de l'uranium probablement consécutive à son endocytose et à son accumulation dans les lysosomes. La cytotoxicité de l'uranium, dont le seuil est aux environs de $300\mu\text{M}$, est actuellement corrélée à l'apparition de ces précipités.

Puisque la localisation de l'uranium à faible concentration reste aujourd'hui méconnue, nous avons utilisé un outil d'imagerie innovant dans le domaine de la biologie : le SIMS (Spectrométrie de masse des ions secondaires). Cette technique permet d'analyser finement la composition élémentaire et isotopique de la surface de l'échantillon. Pour ce faire, des cellules (rénales, hépatiques et neuronales) ont été mises en culture en présence d'uranium à des concentrations non cytotoxiques (10 , 50 et $100\mu\text{M}$). Après 24 heures d'incubation, les cellules ont été fixées sur leur support de culture puis incorporées dans une résine. L'utilisation du SIMS nous a alors permis de localiser l'uranium sur des coupes de cellules. Dès $100\mu\text{M}$, des précipités d'uranium sont observés dans les milieux intra- et extracellulaires. Aux concentrations inférieures, le SIMS a permis de mettre en évidence la localisation d'uranium sous forme soluble et nous avons pu montrer pour la première fois une distribution préférentielle du composé dans le compartiment nucléaire.

La mise en évidence de la distribution nucléaire de l'uranium suscite de nombreuses questions, dont celles relatives au(x) mécanisme(s) d'entrée de l'uranium dans les compartiments cellulaires.

**Exposition de macrophages humains aux hydrocarbures aromatiques polycycliques :
identification de nouvelles cibles moléculaires**

**Lydie SPARFEL^a, Marie-Laure PINEL-MARIE^a, Magali BOIZE^b, Serge KOSCIELNY^c,
Sophie DESMOTS^d, Alexandre PERY^d et Olivier FARDEL^{a,c}.**

^aEA ScRAIC, IRSET, Faculté de Pharmacie, RENNES

^bService des études médicales – EDF, PARIS

^cINSTITUT Gustave Roussy, VILLEJUIF

^dINERIS, VERNEUIL-EN-HALATTE

^eDépartement HITC, Centre Hospitalier Universitaire, RENNES

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), comme le benzo(*a*)pyrene (BaP), sont des polluants environnementaux ubiquitaires exerçant une toxicité importante sur la santé humaine tels que des effets cancérogènes, immunosuppresseurs et inflammatoires. Parmi les différents types cellulaires affectés par le BaP, le macrophage humain différencié, exprimant un récepteur aux hydrocarbures (RAh) fonctionnel, constitue une cible notable. Toutefois, les différentes cibles moléculaires macrophagiques du BaP restent mal connues. Nous avons ainsi analysé le transcriptome de macrophages, obtenus après différenciation de monocytes humains, puis exposés au BaP, en utilisant des puces à ADN pangénomiques. Nos résultats montrent que le BaP module l'expression de 96 et de 1110 gènes d'un facteur 2 ou plus dans les macrophages après un traitement de 8 et 24 heures, respectivement. Parmi ces gènes, nous retrouvons des signatures moléculaires d'exposition aux HAPs, telles que l'interleukine 1 β ou le répresseur du RAh, mais aussi de nouveaux gènes non préalablement mis en évidence comme étant régulés par les HAPs, tels que le récepteur aux chimiokines CXCR5 ou le gène régulateur de la voie ras, RASAL1. Après avoir validé nos données transcriptomiques par RT-qPCR, l'analyse *in silico* nous a permis de montrer qu'un grand nombre de gènes régulés par le BaP était impliqué dans l'immunité, l'inflammation et la mort cellulaire et que les voies majeures de signalisation activées étaient les voies du RAh et de p53. Nous avons confirmé l'implication de ces 2 voies par le fait que la transfection d'un ARN interférent dirigé contre le RAh et l'utilisation de la pifithrine- α , inhibant la transactivation p53-dépendante, bloquent l'induction macrophagique par le BaP des gènes dépendants de ces voies. La détermination de la signature génique des macrophages humains exposés au BaP contribue donc à mieux comprendre les mécanismes moléculaires et les réseaux de gènes impliqués dans l'immunotoxicité des HAPs chez l'homme.

Effet du bézafibrate sur le protéome d'hépatocytes humains en culture primaire et influence de l'environnement redox : séparation par chromatographie liquide 2-D et identification par spectrométrie de masse.

Alvergnas M.^{1,2}, Rouleau A.², Lucchi G.², Manton G.², Heyd B.², Richert L.³, Ducoroy P.², Martin H.^{1,2}.

1. Laboratoire de Toxicologie Cellulaire, EA 4267, UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques, 25030 Besançon cedex, France

2. Plateforme Protéomique CLIPP, Besançon-Dijon, France

3. Service de Chirurgie Digestive et Viscérale, Centre de Transplantation Hépatique, Hôpital Jean Minjoz, 25000 Besançon, France

Les fibrates sont utilisés chez l'Homme dans le traitement des hypertriglycéridémies et hypercholestérolémies. Alors que le mécanisme d'action des fibrates a été bien caractérisé chez le rat, encore peu d'études ont été menées chez l'Homme. Nous avons récemment montré que le traitement d'hépatocytes en culture par différents fibrates modifie l'expression du cytochrome P450 (CYP) 4A, avec des différences inter-espèces (rat vs Homme). De plus, la N-acétylcystéine (Nac) ajoutée aux cultures traitées par du bézafibrate modifie les effets de ce dernier sur l'expression du CYP4A. Afin de mieux connaître le mécanisme d'action des fibrates chez l'Homme, la présente étude analyse l'effet du bézafibrate (Béfizat[®]) en absence et présence de Nac, sur le protéome hépatique chez l'Homme. Pour cela, des hépatocytes provenant de trois donneurs ont été traités pendant 72 heures avec du bézafibrate 250µM et/ou de la NAC 0 ou 1 mM. Les protéines hépatiques ont été extraites puis séparées par 2D-LC (Pf2D, Beckman Coulter) ; les 19 protéines majoritairement régulées, d'un facteur variant entre -12 à 5 fois comparativement aux cultures contrôles, ont été identifiées par analyse en spectrométrie de masse (MALDI-TOF, Brucker Daltonics) et recherche dans la base de données Mascot (SwissProt). Cette étude montre que le bézafibrate modifie l'expression des protéines impliquées dans différentes voies métaboliques, du métabolisme des lipides au stress oxydant en passant par le métabolisme énergétique. Le co-traitement des hépatocytes avec la Nac potentialise l'effet du bézafibrate (notamment sur l'expression de la peroxiredoxine-1) ou au contraire l'annule (par exemple l'ATP synthase présente au niveau de la membrane mitochondriale). Notre étude met donc en évidence l'importance de connaître et prendre en compte l'impact de l'environnement redox lors d'un traitement par des fibrates en clinique humaine.

EFFETS D'AEROSOLS URBAINS ET RURAUX SUR DES CELLULES EPITHELIALES RESPIRATOIRES : IMPLICATION DE LA TAILLE ET DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DE L'AEROSOL.

Stéphanie Val¹, Laurent Martinon², Hélène Cachier³, Abdou Yahyaoui⁴, Hélène Marfaing⁵, Armelle Baeza-Squiban¹

1 : Université Paris Diderot- Paris 7, Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative EAC CNRS 7059, Laboratoire des Réponses Moléculaires et Cellulaires aux Xénobiotiques, 5 rue Thomas Mann, 75205 Paris Cedex 13, France

2 : Laboratoire d'Etude des Particules Inhalées, Mairie de Paris, 11, rue George-Eastman, 75013 Paris, France

3 : Laboratoire des Sciences du Climat et de l'Environnement, CEA-CNRS, Orme des merisiers, Bâtiment 701 - point courrier 129, Centre de Saclay, 91190 Gif sur Yvette cedex, France

4 : Lig'Air, rue de Carbone, 45100 Orléans, France

5 : Airparif, 7 rue Crillon, 75004 Paris, France

Alors que de nombreuses études épidémiologiques montrent un lien entre la pollution particulaire dans l'air et une augmentation de la mortalité et de la morbidité dues à des problèmes respiratoires, les mécanismes sous-jacents et le rôle de la physico-chimie des particules restent encore mal compris.

Dans ce contexte, nous avons utilisé un modèle cellulaire bronchique humain *in vitro* que nous avons exposé à des particules atmosphériques (PM) de tailles et d'origines différentes afin de déterminer leurs effets sur des gènes potentiellement induits par ces particules.

Des PM ont été prélevées à proximité du trafic routier (Porte d'Auteuil, 75) et en milieu rural en période d'épandage de pesticides (Oysonville, 28) selon trois modes : ultrafin (UF), fin (F) et grossier (G). Des cellules bronchiques humaines (16HBE et cellules primaires NHBE) ont été traitées de 4 à 24h, à des concentrations non cytotoxiques (de 0,1 à 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) et différents biomarqueurs ont été évalués. Les fractions les plus fines des deux sites ont des effets pro-inflammatoires dès 24h d'exposition à partir de 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. En effet, elles induisent l'expression de cytokines pro-inflammatoires (GM-CSF et IL-6) de manière dépendante de la concentration en PM. Une induction de l'expression des gènes du métabolisme des xénobiotiques a pu être démontrée pour le cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) et la NADPH-quinone oxydoréductase 1 (NQO-1), ceci traduisant la biodisponibilité des composés organiques présents sur les PM. De plus, les effets des PM semblent être liés au stress oxydant puisque l'enzyme anti-oxydante hème oxygénase 1 (HO-1) est induite par les UF et les F.

A isomasse, les UF agricoles ont une réactivité plus marquée que les UF urbaines qui pourrait être liée à une fraction organique carbonée soluble plus élevée mais ce résultat est à relativiser car les UF sont dix fois moins abondantes en milieu rural qu'en milieu urbain.

Expression génique des lymphocytes T humains exposés à l'arsenic inorganique

Corinne Martin-Chouly, Mélodie Bonvallet, Claudie Morzadec, Olivier Fardel et Laurent Vernhet

EA-4427 Signalisation et Réponses aux Agents Infectieux et Chimiques (EA-SeRAIC), Institut de Recherche en Santé Environnement Travail (IRSET), Université de Rennes-1

L'arsenic inorganique (iAs) est un métalloïde cancérigène présentant des propriétés immunotoxiques. L'objectif de cette étude a été de déterminer si l'iAs module *in vitro* l'expression génique des lymphocytes T (LTs) humains qui participent à l'immuno-surveillance des tumeurs. Pour cela, nous avons réalisé le transcriptome de LTs humains triés, pré-traités ou non par l'iAs (arsénite, 1 μ M, 2h) puis stimulés par la phytohemagglutinine (PHA) pendant 72h. Les ADNc, générés à partir des ARNs extraits de six cultures de LTs, ont été hybridés en monocouleur sur des puces pangénomiques.

Les résultats montrent que l'iAs altère l'expression d'un nombre hétérogène de gènes entre les six cultures de LTs. 40 gènes sont toutefois systématiquement induits dans ces six cultures. Le métalloïde augmente notamment l'expression de gènes de la fonction immune dont celle du gène IL2 qui joue un rôle clé dans l'activation lymphocytaire. Après validation des expressions géniques, nous avons étudié la cinétique des effets de l'iAs. Nos résultats montrent que le métalloïde n'augmente l'expression des gènes de la fonction immune qu'à 72h mais qu'il diminue spécifiquement les niveaux maximums d'ARNm IL2 observés à 8h. L'activation optimale du gène IL2 par la PHA requiert un signal de co-stimulation délivré par des cellules accessoires sécrétant les cytokines IL1, IL6 ou TNF α . Afin de déterminer si l'iAs peut réprimer le gène IL2 à 8h en inhibant ce signal, nous avons analysé ses effets sur des globules blancs stimulés par la PHA. Nos résultats démontrent que l'iAs inhibe l'induction du gène IL2 mais qu'il n'a aucun effet sur les gènes IL1, TNF α et IL6.

En conclusion, nos travaux démontrent i) que l'iAs module l'expression génique des LTs et notamment celle du gène IL2, et ii) que les LTs humains en culture primaire constituent un modèle intéressant pour des études toxicogénomiques malgré la variabilité de leur réponse génique.

Gabriel Baverel, Maha El Hage, Rémi Nazaret, Agnès Conjard-Duplany, Bernard Ferrier, Guy Martin.

Metabolys , Faculté de Médecine RTH Laennec, 7 rue G. Paradin, 69372 Lyon Cedex 08
(baverel@metabolys.com).

La probabilité pour un candidat médicament d'obtenir une autorisation de mise sur le marché est très faible malgré un développement très long et un coût considérable en continuelle augmentation. Cette faible productivité de l'industrie pharmaceutique se produit malgré des investissements importants dans les techniques modernes à large échelle que sont les « omiques » (génomique, transcriptomique, protéomique, métabolomique des liquides biologiques). Ces techniques permettent d'identifier et quantifier des biomarqueurs d'intérêts diagnostique et pronostique mais rarement d'intérêt mécanistique.

Metabolys met au service de l'industrie pharmaceutique une approche innovante, la métabolomique cellulaire, permettant d'améliorer cette productivité. Considérant que de nombreux effets toxiques ou bénéfiques résultent d'une interaction négative des composés tests avec les voies métaboliques cellulaires, la métabolomique cellulaire permet de prédire la sécurité de n'importe quel candidat médicament de n'importe quelle classe thérapeutique et l'efficacité de candidats médicaments de 3 grands secteurs pathologiques : maladies métaboliques (diabète), cancer, maladies neurodégénératives. La métabolomique cellulaire combine l'incubation de n'importe quel type cellulaire humain ou animal in vitro avec (i) une mesure de la consommation de substrats physiologiques et de la production de métabolites par des techniques enzymatiques et de RMN du carbone 13 et (ii) une modélisation mathématique originale des voies métaboliques cellulaires. Elle permet de donner une vision panoramique fonctionnelle et quantitative non seulement des voies métaboliques cellulaires et de leur complexité mais aussi des effets néfastes et bénéfiques de très petites quantités de composés tests sur ces voies métaboliques. C'est un précieux outil en appui des décisions précoces de go-no-go apportant une importante réduction des coûts et du temps de développement préclinique d'un candidat médicament.

L'utilité d'une telle approche prédictive, qui a été validée, sera illustrée par 2 exemples, l'un pour un médicament antiépileptique, l'autre pour un candidat médicament antidiabétique.

Un modèle de barrière hémato-testiculaire *in vitro* pour l'évaluation de la reprotoxicité chez le mâle

Legendre A.¹, Desmots S.¹, Lecomte A.¹, Froment P.², Habert R.³, Lemazurier E.¹

¹ Laboratoire de Toxicologie Expérimentale, INERIS, Verneuil en Halatte, France. audrey.legendre@ineris.fr

² INRA - Nouzilly – France

³ INSERM U957-CEA-Université Paris 7, Fontenay aux Roses, France.

Le développement de nouvelles méthodes alternatives représente une priorité pour les études de reprotoxicité depuis que les scientifiques se sont accordés sur l'utilité d'une conception de batteries de tests toxicologiques *in vitro* pour remplacer les études *in vivo*. Notre travail consiste ainsi à développer un modèle *in vitro* du système de défense des testicules, la barrière hémato-testiculaire (BHT). L'objectif est de reproduire le plus fidèlement possible la composition, l'organisation et la fonction principale de la BHT de rat : les fonctions de barrière et de spermatogenèse. Le concept ainsi développé est basé sur une culture en 3 dimensions effectuée dans une chambre bicamérale contenant des cellules péri-tubulaires sous le dessous des inserts et un mélange de cellules de Sertoli, de cellules germinales et de matrice extracellulaire artificielle sur le dessus.

Le modèle présente une organisation cellulaire semblable à celle des tubules séminifères, avec une polarisation des cellules de Sertoli et des cellules germinales au centre de la structure. Une barrière physique avec un compartiment basal et apical est également créée, confirmée par la présence de jonctions serrées entre les cellules de Sertoli et entre les cellules péri-tubulaires. Les relations entre ces cellules et entre la matrice et les cellules influencent l'efficacité des jonctions et la production de signaux intracellulaires au cours de la culture. De plus, dès le 8^{ème} jour de culture, la détection de cellules haploïdes démontre la différenciation des cellules germinales, confirmant la présence d'une spermatogenèse *in vitro* (Legendre *et al*, 2010).

Dans un souci de validation et de valorisation du modèle, des expositions *in vitro* ont été amorcées pour évaluer l'effet de perturbateurs endocriniens sur les fonctions de barrière et/ou de spermatogenèse. De cette façon, ce nouveau modèle se présente comme un système *in vitro* de choix pour l'étude de la reprotoxicité de certains composés chimiques.

15 **Modulation de la localisation cellulaire de la claudine 11 et de la p-glycoprotéine durant le développement postnatal chez le rat : mise en évidence d'un nouveau concept d'auto-défense du testicule immature et implication dans la barrière hémato-testiculaire.**

Legendre A.¹, Desmots S.¹, Lecomte A.¹, Robidel F.¹, Dupont O.¹, Habert R.², Lemazurier E.¹

¹ Laboratoire de Toxicologie Expérimentale- Pole VIVA/DRC -, INERIS, Verneuil en Halatte, France, audrey.legendre@ineris.fr
² INSERM U967-CEA-Université Paris 7, Fontenay aux Roses, France.

Etablie autour de 18 jours après la naissance chez le rat, la barrière hémato-testiculaire (BHT) se définit selon trois compartiments distincts (interstitiel, basal et apical) et est essentielle à la défense du testicule contre les effets néfastes des xénobiotiques. La barrière dite physico-chimique est liée à la présence des jonctions serrées intersertoliennes constituées entre autre par la protéine claudine 11 et celle, dite de pompe à efflux, existe grâce à la présence d'ABC transporteur tel que la p-glycoprotéine, Pgp. Dans ce travail, nous avons démontré la modulation de la localisation de ces deux protéines d'intérêt dans le testicule au cours du développement postnatal de rat. La détection de la claudine 11 au sein de l'épithélium séminifère l'identifie comme marqueur spécifique de la formation de la BHT en deux compartiments distincts et dévoile, chez le rat sexuellement mature, une localisation dépendante du stade du cycle de spermatogenèse. La présence de la Pgp est, elle, modulée au niveau de différents types cellulaires au cours du développement. Chez le rat prépubère et pubère, sa localisation est identifiée au niveau des cellules germinales de type spermatocytes et à l'âge adulte, au niveau des cellules de l'espace interstitiel, des cellules de Sertoli et des spermatides allongés. De plus, sa localisation diffère selon le stade du cycle de spermatogenèse, se distinguant nettement au niveau de la BHT dans les tubules séminifères en stade VIII, une étape clé du cycle. Ces résultats confortent l'implication de la Pgp dans la dynamique des jonctions cellulaires constitutives de l'épithélium mais suggèrent également son rôle en tant que pompe à efflux au niveau de cellules germinales présentes dans le testicule immature. D'autres travaux, étudiant les effets de perturbateurs endocriniens sur la mise en place de la BHT et la localisation de ces deux protéines d'intérêts, sont en cours d'analyse.

**Effets de nanoparticules de carbone (Degussa FW2)
sur la biotransformation d'amines aromatiques cancérogène
par l'arylamine N-acétyltransferase 1 humaine**

Elodie Sanfins¹, Julien Dairou¹, Alain-F Chaffotte², Florent Busi¹, Fernando Rodrigues Lima¹, Jean Marie Dupret¹.

(1) Université Paris Diderot-Paris 7, Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative (BFA), CNRS EAC 4413, Équipe Réponses Moléculaires et Cellulaires aux Xénobiotiques, 75013 Paris, France

(email : elodie.sanfins@free.fr)

(2) Résonance Magnétique Nucléaire des Biomolécules, Dept. B5C, Institut Pasteur, 75015 Paris

Les nanoparticules (NPs) d'une taille inférieure à 100 nm sont produites et/ou utilisées par un grand nombre de secteurs industriels (cosmétologie, les pneumatiques, le textile...). L'augmentation de la production et de la consommation de nanomatériaux nous oblige à évaluer leurs potentiels effets néfastes sur la santé. Parmi les mécanismes mis en jeu, nous nous sommes intéressés dans le cadre de ce travail à l'altération par les NPs, de systèmes enzymatiques de biotransformation des xénobiotiques. En effet, des travaux récents suggèrent que certaines NPs pourraient altérer l'activité de différents enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX) telles que le CYP3A4 ou le CYP2D6.

Les arylamine N-acétyltransférases (NATs) sont des EMX jouant un rôle majeur dans la détoxification et/ou la bioactivation de composés de type amines aromatiques parmi lesquels figurent de nombreux cancérogènes (4-aminobiphényle, benzidine etc.).

Nous avons étudié l'effet de NPs de Noir de carbone (FW2, P60, FR101) sur la biotransformation d'amines aromatiques cancérogènes par l'enzyme NAT1 humaine. Ces NPs sont décrites comme potentiellement toxique et l'exposition à celles-ci peut se faire de manière concomitante à des amines aromatiques par exemple dans le cadre d'activités professionnelles (industrie du caoutchouc,...).

Nos résultats indiquent que l'incubation de l'enzyme NAT1 avec ces NPs entraîne une inhibition dose-dépendante de l'acétylation d'amines aromatiques modèles (2-aminofluorène ou 4-aminosalicylate) avec des valeurs d'IC₅₀ variant selon le type de NPs (15 µg/ml pour FW2, 35 µg/ml pour P60 et 100 µg/ml pour FR101). Des expériences faites en présence de DTT et GSH montrent que l'inhibition n'est pas due à la génération intrinsèque par ces NPs d'espèces réactives de l'oxygène. Des expériences de compétition en présence de BSA (1.5 mg/ml) ont montré que le niveau d'inhibition n'est pas modifié. Des analyses cinétiques et par ultracentrifugation indiquent que l'enzyme s'adsorbe rapidement sur les NPs conduisant à son inhibition. Des expériences de dichroïsme circulaire mettent en évidence que l'interaction entre les NPs et l'enzyme conduit à un changement de sa structure vraisemblablement responsable de son inhibition irréversible. Des approches utilisant des cellules épithéliales pulmonaires (cellules de Clara) montrent que l'enzyme NAT1 présente dans des extraits cellulaires est également inhibée par l'adsorption sur les NPs. Par ailleurs, l'exposition de cellules en culture aux NPs conduit à l'inhibition de l'enzyme NAT1 endogène. Ces données suggèrent que l'exposition à certaines nanoparticules est susceptible d'altérer la métabolisation de polluants de type amines aromatiques.

Implication du récepteur bêta2-adrénérique dans l'augmentation de la concentration calcique intracytosolique provoquée par les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les cellules endothéliales HMEC-1.

Abdullah Mavati*, Eric Le Ferrec, Nicolas Levoïn, Hervé Paris, Arnaud Courtois, Philippe Uriac, Monique N'Diaye, Dominique Lagadic-Gossmann et Olivier Fardel.

*EA 4427 SeRAIC IFR140, Université de Rennes 1, 2 Avenue du Pr L. Bernard, 35043 Rennes, France

Résumé

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), comme le benzo(a)pyrène (B(a)P), sont des contaminants majeurs de l'environnement impliqués dans la survenue de pathologies humaines comme des cancers et des maladies cardiovasculaires. Ces composés sont notamment connus pour provoquer une augmentation transitoire de la concentration calcique intracytosolique ($[Ca^{2+}]_i$). Cependant, l'origine de ce signal calcique reste encore mal connue.

Aussi, cette étude a pour but de caractériser l'origine du signal calcique provoqué par les HAPs. Nos résultats montrent que, dans les cellules endothéliales HMEC-1, les antagonistes aspécifiques des récepteurs bêta-adrénériques (comme le carazolol et le propranolol), ainsi que les antagonistes spécifiques du récepteur bêta2-adrénérique (R β 2-AD) (comme l'ICI-118,551), inhibent le signal calcique provoqué par le B(a)P. Une inhibition similaire est observée lors de l'utilisation de siARNs ou d'anticorps dirigés contre le récepteur R β 2-AD. Par ailleurs, la surexpression de ce récepteur dans les cellules HEKs, connues pour exprimer très faiblement le R β 2-AD à l'état basal, s'accompagne de l'apparition de l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ lors de l'exposition au B(a)P. De plus, la modélisation moléculaire *in-silico* et les études de binding, montrent que le B(a)P est capable de se lier directement au R β 2-AD avec un K_d proche de 10 nM.

L'ensemble de ces résultats montre que, dans nos modèles, le signal calcique provoqué par le B(a)P implique une interaction directe avec le R β 2-AD. En conséquence, ces données pourraient suggérer un lien potentiel entre le système adrénérique et les effets toxiques des HAPs.

Effets à long terme d'une exposition répétée à des particules atmosphériques sur la différenciation des cellules épithéliales bronchiques humaines et la réponse pro-inflammatoire.

E. Assémat¹, L. Boublil¹, M.C. Borot¹, F. Marano¹, A. Baeza-Squiban¹

Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative EAC CNRS 4413, Laboratoire des Réponses Moléculaires et Cellulaires aux Xénobiotiques, Université Paris Diderot- Paris 7.

Le but de notre étude est de déterminer les effets à long terme de l'exposition aux particules atmosphériques sur la différenciation de l'épithélium bronchique afin d'évaluer leur contribution dans le remodelage des voies respiratoires.

Des cellules épithéliales bronchiques primaires humaines NHBE sont mises en culture en interface air-liquide jusqu'à 2 mois afin d'induire une différenciation mucociliaire. Au début de la différenciation les cellules sont exposées de façon répétée (4 fois) pendant 6 heures à des particules atmosphériques (PM) de différentes tailles (grossières (G), fines (F) et ultrafines (UF) ou à des particules diesel (DEP) à 2, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Les 4 traitements sont espacés de 48h pendant lesquels la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance est mesurée dans le compartiment basolatéral. Le GM-CSF et l'IL-6 sont libérés 48h après chaque traitement de manière dose dépendante, et ces sécrétions sont maintenues lors des 6 semaines. L'Amphiréguline (ligand de l'EGFR) est également sécrétée de manière dose dépendante mais la sécrétion diminue après la fin des traitements. Ces résultats sont corrélés avec l'expression des gènes du GM-CSF et de l'Amphiréguline.

De plus, l'expression de l'ARNm du cytochrome P450 1A1 est fortement induite par les traitements, puis diminue considérablement par la suite. Les ARNm de MUC5AC (mucine) et de DNALI1 (dynéine des cils) ont été mesurés afin de caractériser la différenciation épithéliale mucociliaire. Après 6 semaines, le gène MUC5AC est fortement induit dans les cellules exposées aux DEP et aux PM F et UF par rapport aux conditions contrôle. Nous avons également observé à 3 semaines une induction du gène codant pour MMP9, une protéase impliquée dans le remodelage tissulaire normal et pathologique.

Nos résultats suggèrent qu'une exposition répétée des cellules épithéliales respiratoires aux particules conduit à une réponse pro-inflammatoire soutenue et à une évolution vers un phénotype muqueux.

Financé par ANR Megatox CESA 009 02

19 **Analyse des interactions entre les sulfotransférases et leurs inhibiteurs : perspectives de prédiction de la toxicité induite par les sulfotransférases**

Martiny V.Y., Moroy G., Badel A. et Miteva M.A.

Molécules Thérapeutiques *in silico* (MTi), Université Paris Diderot - Inserm UMR-S 973, Batiment Lamarck, 35 rue Hélène Brion, 75205 Paris Cedex 13.

Les composés chimiques d'intérêt thérapeutique peuvent être caractérisés en termes de biodisponibilité et de toxicité potentielle. Généralement, afin d'évaluer les possibles effets toxiques et la biodisponibilité chez l'Homme, les composés issus des campagnes de criblage sont soumis à un profilage pharmaceutique constitué d'un ensemble de tests d'ADME-Tox (Administration, Distribution, Métabolisme, Excrétion, Toxicité) *in vitro* ou chez l'animal. Cependant, une analyse informatique des composés est possible, avant ou après le criblage, réduisant ainsi le nombre de tests expérimentaux à réaliser. Les paramètres d'ADME-Tox sont liés aux propriétés physico-chimiques des composés, à leur absorption intestinale, à leur stabilité/réactivité, à leur métabolisme hépatique ou à leur interaction avec les mécanismes de régulation cellulaire. Ainsi, les propriétés ADME-Tox de certaines molécules peuvent parfois provenir de leur modification par interaction avec d'autres protéines dans la cellule avec pour conséquence une possible toxicité pour l'organisme. La famille des sulfotransférases (SULTs) a ainsi été récemment démontrée comme jouant un rôle dans ce processus. Notre objectif est de prédire par des approches *in silico* l'interaction de composés chimiques avec les SULTs et pouvant donc potentiellement devenir toxiques. Dans ce but, nous avons appliqué des méthodes 3D de type « docking/scoring » à partir des structures tridimensionnelles des SULTs pour prédire le mode de fixation de ligands connus. Nous avons étudié la flexibilité des sites actifs connus pour jouer un rôle important dans leur interaction avec les ligands afin de tenir compte des changements conformationnels.

Role of Nanoparticle Chemical Composition in Apoptotic Effects

Salik Hussain, Ioana Ferecatu, Caroline Borot, Karine Andreau, Armelle Baeza-Squiban, Francelyne Marano and Sonja Boland

Unit of Functional and Adaptive Biology (BFA) CNRS EAC 7059, Laboratory of Molecular and Cellular Responses to Xenobiotics, Université Paris Diderot - Paris 7
Salik.hussain@univ-paris-diderot.fr

Background:

Although there is rapid transfer of technical research to consumer products in the sector of nanotechnology the understanding of occupational and environmental health effects of the nanoparticles (NPs) is still a neglected field.

Objectives:

We have previously shown that both CB and TiO₂ NPs induce cytotoxicity in 16HBE14o- cell line [1]. The objective of the present study was to characterize the cytotoxic effects of carbon black (CB) and titanium dioxide (TiO₂) NPs in bronchial epithelial cells (16HBE14o- cell line and normal human bronchial (NHBE) cells).

Findings:

NPs were thoroughly characterized by dynamic light scattering and electron microscopy. Both CB and NPs induce apoptosis in a bronchial epithelial cell line 16HBE14o-. Apoptotic cells exhibit decrease in cell size, peripheral chromatin condensation, phosphatidylserine exposure, caspase activation and DNA fragmentation. A decrease in mitochondrial membrane potential, activation of Bax and release of cytochrome c from mitochondria were only observed in case of CB NPs whereas lysosomal membrane destabilization, lipid peroxidation and release of cathepsin B was only observed for TiO₂ NPs. Furthermore, reactive oxygen species (ROS) production was observed after exposure to CB and TiO₂ but H₂O₂ was only implicated in apoptosis induction by CB NPs.

Conclusion:

CB NP induced apoptosis by a ROS dependent mitochondrial pathway. TiO₂ NPs undergo cell death through lipid peroxidation and lysosomal membrane destabilization. Although the final outcome might be the same (apoptosis), the molecular pathways activated by NPs differ depending upon the chemical nature of the NPs.

[1]. Hussain S et al., *Toxicology* 260 (2009) 142–149.

Funding:

"ANR (0599-5 SET024-01); FP7 (N° 201335)"

Les composés HAP contribuent à l'effet anti-apoptotique des particules fines atmosphériques (PM_{2.5}) par la voie du récepteur Aryl Hydrocarbone (AhR).

Ioana Ferecatu, Marie-Caroline Borot, Mélanie Leroux, Francelyne Marano, Armelle Baeza-Squiban, Karine Andraeu

CNRS EAC 4413 –Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative (BFA), Laboratoire de Réponses Moléculaires et Cellulaires aux Xénobiotiques (RM CX). Université Paris Diderot-Paris 7, 75013 Paris, France

Actuellement, la pollution atmosphérique constitue un véritable problème de santé publique et d'environnement. Les particules atmosphériques nommées PM «Particulate Matter» sont classées selon leur taille (PM_{0.1}; PM_{2.5} et PM₁₀). Les PM_{2.5} (entre 0.1 et 2,5 µm) résultent d'activités diverses et sont constituées d'un mélange complexe de composés et de molécules adsorbées sur un cœur carboné telles que des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), des métaux et des composés biologiques. L'exposition aux PM se fait par voie respiratoire et il a été démontré qu'elle augmente la mortalité et la morbidité d'origine respiratoire et cardio-vasculaire ainsi que la prévalence des cancers pulmonaires. Au niveau cellulaire, l'exposition aux PM_{2.5} induit une réponse inflammatoire exacerbée, un stress oxydant, des effets génotoxiques, ainsi qu'une modulation de l'apoptose ; autant de dérégulations retrouvées dans les cellules cancéreuses.

Ainsi, nous étudions l'effet de quatre lots de PM_{2.5} prélevées à Paris pendant l'été et l'hiver 2003, dans deux sites correspondant à une pollution liée au trafic routier (périphérique Porte d'Auteuil, lots AH03 et AEO3) et une pollution de fond (Vitry sur Seine, lots VH03 et VEO3) sur la régulation de l'apoptose.

L'étude de 3 différentes lignées cellulaires ainsi que des cellules primaires bronchiques humaines a mis en évidence une activité anti-apoptotique des PM_{2.5}. Un prétraitement de 4 heures aux particules, réduit l'apoptose provoquée par 3 inducteurs spécifiques (A23187, Staurosporine et Oligomycine), et permet aux cellules de conserver une morphologie nucléaire et mitochondriale normale. Cet effet anti-apoptotique s'exerce dès 10 µg/cm² de PM_{2.5} mais est spécifique des lots AH03, AEO3 et VH03 en corrélation avec la teneur en HAP et/ou en composés hydrosolubles. Enfin, des expériences complémentaires (agoniste, antagoniste, et « silencing » du récepteur aux HAP (siAhR)) nous permettent de suggérer le rôle des HAP dans l'effet anti-apoptotiques des PM_{2.5} via de la voie du AhR.

Transition épithélio-mésenchymateuse et hépatocarcinome : Implication de Erk1/2 et Snail

Zucchini-Pascal Nathalie, Peyre Ludovic, Rahmani Roger

Laboratoire de Toxicologie Cellulaire, Moléculaire et Génomique, UMR 1089, INRA, 06903
Sophia Antipolis

Les hépatocarcinomes (HC) représentent un cancer sur cinq. La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) constitue un processus capital dans l'initiation, le développement et l'expansion de ces cancers. Elle interviendrait dans l'établissement d'un état fibrotique au cours des maladies chroniques du foie (l'acteur majeur de prédisposition aux HC), mais également dans le développement métastatique. La TEM se décrit comme le processus par lequel des cellules épithéliales perdent leurs propriétés cellulaires et acquièrent des capacités invasives et migratoires, adoptant un phénotype mésenchymateux. Afin de mieux caractériser les bases moléculaires de la TEM au niveau du foie, nous avons analysé les effets du TPA (12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate) sur les cellules de la lignée HepG2. Nous avons pu démontrer que le TPA entraîne une TEM, selon un mécanisme MAPK-Erk1/2-dépendant. Ainsi, l'inactivation de ces kinases par le U0126 prévient les événements moléculaires et cellulaires mis en jeu lors de la TEM induite par le TPA, tels que la répression génique de la E-cadhérine, la néoexpression de la vimentine, l'induction de S100a4 et de l'itga5, la réorganisation du cytosquelette d'actine, la dissociation des jonctions intercellulaires, etc.... De plus, par la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), nous avons montré que la répression génique de la E-cadhérine induite par le TPA est opérée par le facteur Snail de manière Erk1/2-dépendante. En outre, l'inactivation de l'expression de Snail par des siRNA spécifiques restaure les caractéristiques épithéliales des HepG2 traitées par le TPA. Cette étude démontre au total que le TPA entraîne, via l'activation de Erk1/2, l'induction et la translocation nucléaire de Snail (responsable la répression de la E-cadhérine), ainsi que tous les événements cellulaires nécessaires à l'initiation de la TEM. Ces travaux suggèrent donc que la co-régulation entre la voie Erk et le facteur Snail joue un rôle capital dans le développement de la fibrogénèse et des processus métastatiques au niveau hépatique.

ROGUE Alexandra^{a, b}, SPIRE Catherine^b, CLAUDE Nancy^b et GUILLOUZO André^a

^aINSERM U991 et Université de Rennes 1, 35043 Rennes, France et ^bServier Group, Drug Safety Assessment, 45403 Orléans-Gidy, France

Les glitazones constituent une classe d'agonistes des PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma), utilisées dans le traitement du diabète de type 2. La première molécule synthétisée, la troglitazone a été retirée du marché peu après sa commercialisation en raison de plusieurs cas d'hépatotoxicité sévère. La seconde génération de molécules est mieux tolérée bien que de rares cas de toxicité hépatique aient été rapportés. Le développement d'agonistes des 2 types de récepteurs PPAR, alpha et gamma, les glitazars, a également été envisagé mais a été interrompu en raison de toxicités rénales et cardiaques. Les mécanismes impliqués dans ces toxicités restent peu connus. Nous avons analysé les changements d'expression de gènes induits par deux agonistes PPAR γ (troglitazone et rosiglitazone) et deux agonistes PPAR α/γ (muraglitazar et tésaglitazar) dans des cultures primaires d'hépatocytes humains provenant de 5 donneurs. Les cellules ont été exposées à différentes concentrations de chaque produit pendant 24 heures et leurs transcriptomes ont été étudiés à l'aide de puces à ADN pangénomiques. Les profils d'expression de gènes obtenus avec les hépatocytes humains montrent une très grande variabilité de réponse aux différents ligands. Les signatures se regroupent surtout en fonction du lot d'hépatocytes et non par type d'agoniste (PPAR γ ou PPAR α/γ) ou par composé. De plus, le nombre de gènes communément modulés par un même traitement dans l'ensemble des populations d'hépatocytes est relativement faible par comparaison avec le nombre total de gènes modulés dans chaque lot (fold-change \geq 1.5 et $p < 0.01$). Pour les glitazones, sur l'ensemble des gènes modulés dans chaque population d'hépatocytes humains seuls 0,8% à 30% sont communs aux cinq lots : ils incluent des gènes du métabolisme lipidique tel que « l'adipose differentiation-related protein ». En conclusion notre étude démontre que la variabilité interindividuelle joue un rôle important dans la réponse transcriptomique des hépatocytes humains aux agonistes des PPAR γ et PPAR α/γ .

Rozenn Jossé, Alexandra Rogue, Carine Lambert, Marie-Anne Robin et André Guillouzo.

Inserm U991 et Université de Rennes 1, Rennes

L'aflatoxine B1 (AFB1) est un puissant hépatocarcérogène génotoxique chez l'homme. Cependant les événements moléculaires précoces induits par cette mycotoxine restent mal connus. Nous avons étudié les modifications d'expression de gènes induites par l'AFB1 dans des hépatocytes humains en culture primaire et les cellules HepaRG différenciées qui expriment une protéine p53 normale. Les cellules ont été exposées à 2 concentrations d'AFB1 (0.05 et 0.25 μ M) et leurs transcriptomes analysés à l'aide de puces à ADN Agilent 4x44k après 24h de traitement. Nos résultats montrent que les signatures géniques se regroupent par modèle cellulaire et non en fonction de la concentration d'AFB1. Le nombre de gènes modulés par l'AFB1 est plus faible dans les hépatocytes humains que dans les cellules HepaRG (FC 1,5 et $p \leq 0,01$). Les principales fonctions biologiques altérées sont l'activité apoptotique et la réponse aux dommages à l'ADN dans les hépatocytes humains, la division cellulaire et le métabolisme des xénobiotiques dans les cellules HepaRG. Bien que les gènes dérégulés dans les deux modèles cellulaires soient peu nombreux ils incluent dans tous les cas, des gènes de la voie p53 et quelques gènes clés de la réponse toxique de l'AFB1. Les différences observées entre les 2 modèles sont au moins en partie liées au caractère transformé des cellules HepaRG d'une part, et à l'activité transcriptionnelle réduite et l'incapacité à se diviser des hépatocytes humains en culture primaire d'autre part.

Ce travail a été soutenu par l'ANR (Contrat 06SEST17) et la Ligue 35 contre le Cancer.

Analyse des corrélations entre les résultats d'études *in vitro* et cliniques pour une centaine de formulations cosmétiques :

a) du point de vue de la tolérance cutanée

M.-P. Berrada^a, V. Millet^a, I. Boudières^a, A. Duizabo^a, M. Templier^b, S. Bessou-Touya^b, P.-J. Ferret^{a*}

^a Service évaluation sécurité Produits finis, Pierre Fabre Dermo Cosmétique, Parc Technologique du canal - Europarc - Bât M25, 4 rue Marie Curie - BP 22132 - 31521 Ramonville

^b Centre expérimental et pharmacocinétique de Campans, Bel Air de Campans 81106 Castres

De nombreux protocoles *in vitro*, impliquant des modèles cellulaires, tissulaires ou organotypiques sont actuellement employés dans le but d'évaluer le risque d'irritation oculaire et/ou cutanée des ingrédients cosmétiques ainsi que des produits finis. La principale difficulté pour déterminer la validité de ces méthodes *in vitro* réside dans le manque de données auxquelles se comparer, qu'elles soient d'origine animale ou humaine.

L'objectif de ce travail était d'étudier la corrélation entre les résultats obtenus sur le modèle *in vitro* d'épidermes reconstruits (RHE) et les résultats d'études de tolérance chez l'homme sous contrôle médical

Une centaine de formulations cosmétiques leave-on de différentes formes galéniques (émulsions, lotions...) destinées à une population d'adultes ou d'enfants/bébés ont été étudiées.

L'évaluation du potentiel irritant cutané par le modèle *in vitro* d'épidermes reconstruits repose sur la détermination de la viabilité cellulaire par incorporation du MTT à 24h et 72h et le dosage de la libération de l'IL1 α à 24h et 72h.

Les études cliniques sous contrôle médical sélectionnées ont été réalisées sur 30 volontaires en moyenne (adultes et/ou enfants/bébés) pendant une durée d'environ 3 semaines en conditions normales d'emploi. Les principaux paramètres étudiés sont soit de nature objective (érythème, oedème, desquamation...), soit de nature subjective (sensation de brûlure, de picotement, de tiraillement...).

Un système de classification à 4 niveaux : 1 = Irritant ; 2 = Modérément irritant ; 3 = Légèrement irritant ; 4 = Non irritant, a été établi pour permettre la comparaison des 2 modèles.

L'ensemble des résultats montre une corrélation excellente entre les données obtenues *in vitro* et en clinique (> 95%).

Les faux-positifs et/ou faux-négatifs rencontrés seront discutés.

* correspondant : tel : 05 62 24 76 57 , e-mail : pierre-jacques.ferret@pierre-fabre.com



Analyse des corrélations entre les résultats d'études *in vitro* et cliniques pour une centaine de formulations cosmétiques :

b) du point de vue de la tolérance oculaire

M.-P. Berrada^a, A. Duizabo^a, I. Boudières^a, V. Millet^a, M. Templier^b, S. Bessou-Touya^b, P.-J. Ferret^{a*}

^a Service évaluation sécurité Produits finis, Pierre Fabre Dermo Cosmétique, Parc Technologique du canal - Europarc - Bât M25, 4 rue Marie Curie - BP 22132 - 31521 Ramonville

^b Centre expérimental et pharmacocinétique de Campans, Bel Air de Campans 81106 Castres

De nombreux protocoles *in vitro*, impliquant des modèles cellulaires, tissulaires ou organotypiques sont actuellement employés dans le but d'évaluer le risque d'irritation oculaire et/ou cutanée des ingrédients cosmétiques ainsi que des produits finis. La principale difficulté pour déterminer la validité de ces méthodes *in vitro* réside dans le manque de données auxquelles se comparer, qu'elles soient d'origine animale ou humaine.

L'objectif de ce travail était d'étudier la corrélation entre les résultats obtenus sur trois modèles *in vitro* d'évaluation de la tolérance oculaire: Relargage Rouge Neutre (RRN), Epithélium de cornée humaine reconstituée Skinethic® (HCE), Membrane chorio-allantoïdienne d'œuf de poule (HET CAM), et ceux obtenus lors d'études cliniques de tolérance sous contrôle ophtalmologique.

Les principaux paramètres étudiés au cours des études chez l'Homme sont, soit de nature objective (modification de la sécrétion lacrymale, érythème bulbaire, œdème de la conjonctive, inflammation de la cornée...), soit de nature subjective (sensation de sécheresse oculaire, photophobie, sensation de picotement...).

75 produits ont été retenus en tout : 48 produits non rincés ont été testés selon le protocole RRN, 57 produits non rincés ont été testés selon le protocole HCE pur et/ou dilué à 10%, 22 produits ont fait l'objet d'études HET CAM pur, dilué à 1%, dilué à 5% et/ou dilué à 10%.

Un système de classification à 4 niveaux a été établi pour permettre la comparaison des résultats des études *in vitro* et cliniques : 1 = irritant ; 2 = modérément irritant ; 3 = légèrement irritant, 4 = pratiquement non irritant.

La corrélation des résultats obtenus pour les 48 produits sur le modèle RRN, et en tolérance sous contrôle ophtalmologique est excellente (96%).

On obtient une bonne corrélation (72%) entre les résultats obtenus sur le modèle HCE (produits testés pur et dilué à 10%) et ceux obtenus lors d'études sous contrôle ophtalmologique.

Une corrélation similaire est observée pour l'ensemble des résultats obtenus sur le modèle HET CAM (72%).

Les faux- positifs et les faux- négatifs rencontrés seront discutés.

* correspondant : tel + 33 5 62 24 76 57 , e-mail : pierre-jacques.ferret@pierre-fabre.com

Interaction of nanoparticules used in medical applications with lung epithelial cells: uptake, cytotoxicity, oxidative stress and pro-inflammatory response.

Rina Guadagnini (1), Sonja Bolland (1), Sandra Vranic (1), Salik Hussain (1), Kevin Moreau (1), Marie Caroline Borot (1), Armelle Baeza (1), Francelyne Marano (1)

1) Unit of Functional and Adaptive Biology (BFA) CNRS EAC 4413, Laboratory of Molecular and Cellular Responses to Xenobiotics, University Paris Diderot - Paris 7, CC 7073, 75205 Paris cedex 13, France.

In view of the considerable development of nanotechnologies and nanomedicine it is important to evaluate the potential risk of NPs for human health. Our goal was to determine the effects of nanoparticles (NPs) on the lung, the first target during inhalation of NPs. We investigated the effects of different NPs [TiO₂, poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA), non coated Fe₃O₄ and Fe₃O₄ coated with oleic acid] on human bronchial (16HBE line) and human alveolar type II cells (A549 line).

We evaluated the cytotoxicity of these NPs by WST-1 assay and propidium iodide incorporation showing that toxicity depends on particle type, size and coating. We determined the ability of NPs to enter cells measuring by flow cytometry the right angle scattering of the laser and we demonstrated that they can be internalized by cells. We measured also the induction of oxidative stress in 16HBE and A549 cells by flow cytometry using the dihydroethidium oxidation assay showing that these NPs have different abilities to induce oxidative stress. Furthermore treatment with NPs could induce a depletion of the thiol content in A549 and 16HBE cells (measured using monoBromoBimane assay by flow cytometry). Finally we investigated whether NPs have the capacity to induce an inflammatory response. We determined the production of cytokines (GM-CSF, IL-8, IL-6) by A549 and 16HBE cells after 24 and 48 hours of treatment with NPs by ELISA test and by RT- qPCR. Results show that at non toxic concentrations NPs can induce inflammation in respiratory epithelial cells.

Supported by FP7 program NanoTEST and by AFSSET project n° EST-2008/1/49.

Phospholipidose et stéatose induites par l'amiodarone dans les cellules de l'hépatome humain HepaRG

Sébastien Antherieu^{1,2}, Bernard Fromenty^{1,2}, Marie-Anne Robin^{1,2} et André Guillouzo^{1,2}

¹ Inserm, UMR991, Foie Métabolismes et Cancer, 35033 Rennes, France;

² Université de Rennes 1, 35043 Rennes, France

sebastien.antherieu@univ-rennes1.fr

L'hépatotoxicité d'origine médicamenteuse apparaît généralement après plusieurs semaines voire plusieurs mois de traitement et est souvent non-prévisible ; elle est caractérisée par diverses lésions pouvant impliquer différents mécanismes. Il a été montré que certains médicaments, en particulier l'amiodarone, pouvaient induire une stéatose et une phospholipidose chez quelques patients. Nous avons étudié les effets aigus et chroniques de l'amiodarone dans la lignée d'hépatome humain HepaRG. Lorsqu'elle est différenciée, cette lignée cellulaire est composée d'hépatocytes et de cellules biliaires (50/50) et reste fonctionnellement stable pendant plusieurs semaines à confluence. Les cellules HepaRG ont été exposées à l'amiodarone pendant 24 heures (un seul traitement) ou 14 jours (traitement répété tous les 2-3 jours). Après 24 heures de traitement, des vésicules intracytoplasmiques sont observées dans les deux types cellulaires. Celles-ci apparaissent en microscopie électronique sous forme de corps lamellaires, caractéristiques d'une phospholipidose. De plus, aucun marquage à l'huile rouge n'est observé. Par contre, après 14 jours de traitement répété, un autre type de vésicules marquées à l'huile rouge est mis en évidence dans les cellules de type hépatocytaire, ce qui suggère une accumulation de lipides. Ces données ont été confirmées par la quantification des lipides neutres et des phospholipides. En effet, l'amiodarone induit une augmentation dose-dépendante de triglycérides, de phosphatidyléthanolamines et de phosphatidylcholines dans les cellules HepaRG. D'autre part, une étude transcriptomique a montré que l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des lipides est modulée par l'amiodarone. De plus, une réduction de l'oxydation des acides gras a été démontrée par la mesure des produits solubles radiomarqués [C^{14}] de la β -oxydation des acides gras. Ces résultats montrent que l'amiodarone induit une phospholipidose après une exposition aiguë et une phospholipidose associée à une stéatose après une exposition répétée des cellules HepaRG. Ils suggèrent également que ces cellules représentent un modèle *in vitro* pertinent pour des études d'hépatotoxicité chronique chez l'homme. Ces travaux ont été supportés par la Communauté Européenne (Contrat LINTOP-STREP-037499).

REGULATION DE L' APOPTOSE DANS UNE LIGNEE DE LYMPHOCYTES T PAR LES PROTEINES GILZ ET TSC-22

Aurélie PEPIN, Perle LATRE DE LATE, Armelle BIOLA-VIDAMMENT, et Marc PALLARDY.

Inserm UMR-S996, Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, 5, rue JB Clément, 92290 Châtenay-Malabry

Les protéines GILZ (Glucocorticoïd Induced Leucine Zipper) et TSC-22 (TGF- β -stimulated clone-22) appartiennent à la famille de protéines TSC-22D (TSC-22 Domain). Elles sont composées d'une TSC-box et d'un domaine leucine zipper, leur permettant de s'homodimériser et de s'hétérodimériser.

GILZ et TSC-22 sont des inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes T. Par ailleurs, nous avons démontré que GILZ, induit lors de la déprivation en interleukine-2 (IL-2) des lymphocytes T, retarde l'apoptose en inhibant l'activité transcriptionnelle du facteur FOXO3 (Forkhead box class O3) (Asselin-Labat ML et al, 2004). TSC-22, quant à lui, a été décrit comme inducteur de l'apoptose, dans un modèle de carcinome ovarien, et dans un modèle de tumeur de glande salivaire.

Le but de notre étude est de déterminer l'effet de TSC-22 au cours de l'apoptose des lymphocytes T.

Des clones de CTLL-2, une lignée de lymphocytes T CD8⁺ murins, exprimant constitutivement TSC-22, ou GILZ, ont été obtenus. Dans ces cellules déprivées en IL-2, TSC-22 accélère l'entrée en apoptose. L'analyse par Western-Blot de l'expression des protéines apoptotiques révèle une augmentation de l'expression de BIM, ainsi qu'une augmentation du clivage de la procaspase-3 en caspase 3 active.

Par ailleurs, nous avons observé que l'expression de GILZ n'est pas induite dans les clones TSC-22 au cours des premières heures de la déprivation en IL-2. Nos premiers résultats de RT-PCR quantitative suggèrent que TSC-22 régule la transcription de *gilz*. Nous avons, en outre, observé que la protéine TSC-22, cytoplasmique, se relocalise dans le noyau au cours de la déprivation en IL-2. Nous poursuivons actuellement la caractérisation du mécanisme par lequel TSC-22 régule l'expression de GILZ.

Ces travaux démontrent que, dans un modèle de lymphocytes T déprivés en IL-2, les CTLL-2, TSC-22 est pro-apoptotique, car cette protéine inhibe l'expression de la protéine GILZ.

Sabrina Barillet¹, Simona Mura², Elias Fattal², Marc Pallardy¹ et Scadia Kerdine-Romer¹

¹Univ Paris-Sud, INSERM UMR-S 996, Faculté de Pharmacie, 5 rue JB Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex France

²Univ Paris-Sud, CNRS UMR 8612, Faculté de Pharmacie, 5 rue JB Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex France

L'adressage de molécules thérapeutiques vers une cible spécifique constitue un défi majeur pour la médecine. Les nanotechnologies proposent aujourd'hui une solution : les nanovecteurs. Des nanoparticules (NPs) d'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA), un polymère biodégradable, sont ainsi proposées pour la formulation de nanomédicaments à visée pulmonaire. Une évaluation toxicologique de ces nouveaux matériaux est donc nécessaire.

Nous proposons d'évaluer les effets de ces NPs sur des cellules clés du système immunitaire, les cellules dendritiques (DCs), capables de détecter des signaux de danger, subir un processus de maturation, et induire une réponse immune primaire spécifique *via* la stimulation des lymphocytes T. Notre but est notamment d'estimer le potentiel effet adjuvant de la réponse immunitaire de ces NPs.

Des DCs murines (BMDCs) et humaines (MoDCs) constituent nos modèles d'étude. Les BMDCs sont obtenues après différenciation (GM-CSF) de progéniteurs hématopoïétiques issus de la moelle osseuse de fémurs et de tibias de souris C57BL/6. Les MoDCs sont issues de monocytes isolés par sélection sur billes magnétiques anti-CD14 à partir de sang périphérique humain puis différenciés sous l'action de GM-CSF et d'IL-4.

Les NPs, nanosphères hydrophobes d'environ 200 nm, sont, selon l'ajout d'agents chimiques à leur surface (alcool polyvinylique, pluronic F68 ou chitosan), anioniques ou cationiques. Elles peuvent être rendues fluorescentes (ajout de rhodamine).

Après 24h d'exposition, l'internalisation des NPs est étudiée par cytofluorométrie et microscopie. La mort cellulaire est mesurée (MTT, bleu trypan, annexin V/7-AAD) et le phénotype des DCs est caractérisé par cytofluorométrie après immunomarquage fluorescent (CD40, CD86, CD83, molécules du CMH de classe II).

Nos résultats montrent que les NPs s'accumulent dans le cytoplasme des DCs. Une augmentation significative de la mort cellulaire (notamment par apoptose) est notée dans les deux types cellulaires, avec une sensibilité accrue des BMDCs ($CL_{50} \approx 25 \mu\text{g/ml}$) versus MoDCs ($CL_{50} \approx 200 \mu\text{g/ml}$). La maturation des DCs semble également être modulée.

L'analyse transcriptomique révèle de fortes similitudes entre les hépatocytes humains normaux en culture primaire et les cellules HepaRG différenciées

Carine Lambert^{1,2}, Catherine Spire², Alexandra Rogue^{1,2}, Nancy Claude² et André Guilfouzo¹

Inserm U991 et Université de Rennes 1, 35043 Rennes cedex ; Servier group, Drug Safety Assessment, 45520Orléans-Gidy,

L'hépatotoxicité constitue la principale cause de retrait des médicaments du marché. Les mécanismes mis en jeu sont variables et complexes ; dans certains cas l'hépatotoxicité n'affecte qu'un petit nombre d'individus traités et est totalement imprévisible. Les hépatocytes humains en culture primaire représentent le modèle expérimental le plus proche du foie *in vivo* ; cependant, ils sont phénotypiquement instables, ont une durée de vie limitée et montrent une grande variabilité inter-donneur. Les cellules HepaRG issues d'un hépatocarcinome humain, qui ont conservé des activités de biotransformation des xénobiotiques proches de celles des hépatocytes humains primaires pourraient représenter une alternative à ces derniers. Pour préciser les similitudes entre ces 2 modèles cellulaires nous avons utilisé l'approche transcriptomique (puces à ADN Agilent 4x44k, monocouleur), qui permet d'améliorer la prédiction de la toxicité de nouvelles molécules thérapeutiques et de préciser leurs mécanismes d'action. Nous avons comparé différentes conditions expérimentales en combinant des tests statistiques (Anova, t-test) avec l'utilisation de filtres spécifiques (p-value, fold-change, signal médian des intensités) afin de prédire les gènes différemment exprimés et statistiquement spécifiques d'une condition donnée ou communs à plusieurs conditions. La comparaison des transcriptomes a montré qu'environ 80% de gènes constitutivement exprimés dans les hépatocytes humains en culture primaire le sont également dans les cellules HepaRG. Ils incluent notamment la plupart des gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques. D'autre part, la comparaison des profils de gènes modulés par 2 composés (phénobarbital et troglitazone) dont les effets toxiques sont connus, a également montré des réponses proches entre les 2 modèles (induction de CYPs, dérégulation de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique, etc.). Elle a en outre permis d'identifier de nouveaux gènes cibles (par exemple CYP24A1 et CYP4F3 pour le phénobarbital et KIAA1881 et MBL2 pour la troglitazone). Au total, nos résultats confirment et précisent la grande similitude entre hépatocytes humains primaires et cellules HepaRG.

Cette étude a bénéficié du soutien de la CEE (Contrats LIINTOP- STREP-037499 et PREDICT-IV- 202222)

Rôle du facteur de transcription Nrf2 dans le phénotype des cellules THP1 en réponse aux haptènes

Zeina El Ali, Marie-Hélène Damiens, Marc Pallardy et Saadia Kerdine-Römer

Toxicologie et INSERM UMR 996, Faculté de Pharmacie, Université Paris Sud 11, 5 rue J.B. Clément F-92296 Châtenay-Malabry

L'exposition des cellules dendritiques (DC) aux sensibilisants de contact comme le nickel (NiSO_4), ou le 2,4-dinitrochlorobenzène (DNCB) induit l'augmentation de l'expression des marqueurs de surface (CD54 et CD86), la production de cytokine pro-inflammatoires (IL-8 et IL-6) et l'activation des voies de signalisation telles que les Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK). Ces composés génèrent un stress chimique pouvant être perçu comme un signal de danger par les DC qui conduit alors à leur maturation. Parmi les voies de sensibilisation activées par le stress oxydant, la voie Nrf2/Keap1 est centrale pour la détection des composés électrophiles. Afin d'étudier le rôle du facteur de transcription Nrf2 en réponse aux haptènes, nous avons choisi de travailler sur la lignée cellulaire THP1, une lignée myéloïde pro-monocytaire, présentant des propriétés similaires à celles des cellules présentatrices de l'antigène dérivées des monocytes humains.

Les cellules THP1 ont été traitées par le NiSO_4 ou le DNCB ou le cinnamaldéhyde (CinA) à différents temps. Les expressions des 2 protéines Nrf2 et Keap1, en réponse à ces trois haptènes, ont été mesurées par Western Blot. Nous montrons que les 3 haptènes induisent une accumulation de Nrf2 au cours du temps. Pour Keap1, une faible diminution est observée dans les cellules THP1. Par ailleurs, nous montrons, par co-immunoprécipitation (Co-IP), que le complexe Nrf2/Keap1 n'est pas modifié en présence de DNCB.

L'utilisation d'ARN interférants (siRNA) spécifiques de *nrf2* montre que l'expression de la molécule d'adhésion CD54 semble être contrôlée par Nrf2. Par ailleurs, les cellules THP1 invalidées en *nrf2* produisent moins d'IL-8 en réponse au DNCB que les cellules contrôles.

D'autre part, une augmentation des cellules en apoptose est observée en l'absence de Nrf2. Ceci suggère que le facteur de transcription Nrf2 pourrait participer à la survie cellulaire en réponse aux haptènes.

LES AMINES AROMATIQUES HETEROCYCLIQUES INDUISENT DES EFFETS TOXIQUES DIFFERENTS INDIVIDUELLEMENT ET EN MELANGE

Julie Dumont^{a,b,1}, Rozenn Jossé^{a,b}, Carine Lambert^{a,b}, Sébastien Anthérieu^{a,b}, Ludovic Le Hegarat^c, Caroline Aninat^{a,b}, Marie-Anne Robin^{a,b}, Christiane Guguen-Guillouzo^{a,b} and André Guillouzo^{a,b}

^a Inserm U991 et ^b Université de Rennes 1, Rennes ; ^c Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Fougères.

¹ Adresse actuelle: Inserm UMR 744 - Institut Pasteur, Lille.

L'homme est continuellement exposé à des mélanges de contaminants environnementaux et alimentaires. Nous avons comparé, dans des cellules HepaRG différenciées, les effets de 2 amines aromatiques hétérocycliques (AAH) parmi les plus fréquemment retrouvées dans l'alimentation, la 2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) et la 2-amino-3,8-diméthylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) après exposition individuelle ou en mélange. Différents paramètres ont été évalués, notamment la cytotoxicité, l'apoptose, le stress oxydant, les dommages à l'ADN par le test des comètes, les taux d'ARNm et l'activité de certains cytochromes P450 (CYP). Après 24h d'exposition aux 2 AAH, des effets différents ont été observés selon qu'elles étaient ajoutées individuellement ou en mélange. Seule PhIP induit des dommages à l'ADN ; elle induit également plus fortement les CYP1A1 et 1B1 que MeIQx. En revanche seule cette dernière induit le CYP1A2. Un stress oxydant et des effets synergiques sur l'activité apoptotique ont été observés avec le mélange équimolaire des 2 AAH. De plus, la génotoxicité de PhIP est abolie en mélange, probablement en raison d'une inhibition de l'activité du CYP1A2. Ces résultats apportent des données nouvelles sur les mécanismes d'interaction entre PhIP et MeIQx et montrent la nécessité d'étudier les interactions entre les AAH dans l'évaluation du risque pour l'homme. *(Ce travail a été soutenu par l'ANR (Contrat 06SEST17) et est actuellement sous presse dans Toxicology and Applied Pharmacology).*

N. Quignot¹, S. Desmots¹, A. Lecomte¹, F. Robidel¹, R. Barouki², E. Lemazurier¹

¹Ineris, Verneuil-en-Halatte, France

²INSERM U747, Université Paris Descartes, Paris, France

Ces dernières années, des études épidémiologiques menées dans différents pays ont montré une augmentation d'incidence de certaines affections telles que des altérations des fonctions de reproduction et des cancers hormonaux-dépendants. Le rôle des hormones stéroïdes sexuelles dans ce type d'affection est établi depuis longtemps par l'étude de modèles animaux. Il a ensuite été confirmé chez l'homme, *in vitro* sur des lignées cellulaires humaines et *in vivo* par l'efficacité thérapeutique de certains traitements (anti-estrogènes et inhibiteurs de l'aromatase dans les cancers du sein, castration et anti-androgènes dans les cancers de la prostate). Des suspicions sont alors apparues quant à une relation de causalité entre exposition aux perturbateurs du système endocrinien (PEs) et ces affections.

Dans le contexte de la directive européenne REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals, 2007), la gestion du cas des molécules perturbant la fonction endocrinienne reste un challenge. En effet, au-delà du défi technique que constitue la mise en place de méthodes alternatives à l'expérimentation animale, se pose aussi la question de l'adéquation de ces outils à une certaine réalité physiologique ainsi que de leur prédictivité.

La stratégie employée ici est l'intoxication de différents modèles (rats adultes, lignées cellulaires humaines et cultures primaires de cellules gonadiques de rat) à des PEs et à l'observation de réponses induites sur la stéroïdogénèse.

L'objectif du travail est double. D'une part, la confrontation des résultats obtenus *in vivo* chez le rat et *in vitro* sur cultures primaires devrait permettre d'accroître les connaissances mécanistiques quant aux effets des PEs testés. D'autre part, nous tenterons d'identifier des corrélations entre ces trois niveaux d'étude afin de mettre en évidence des biomarqueurs *in vitro* prédictifs d'effets pathologiques *in vivo*. Notamment, la possibilité de transposition à l'homme des résultats observés sur les cellules en culture sera étudiée.

Les résultats obtenus sur lignées cellulaires humaines (JEG-3 et H295R) montrent une action des PEs testés sur les enzymes impliquées dans la dernière étape de la stéroïdogénèse : aromatase et 17-beta hydroxystéroïde déshydrogénase. Dans un premier temps, ils permettent de mieux caractériser l'action des toxiques sur cette étape de la stéroïdogénèse, action qui doit être prise en compte pour l'évaluation de la toxicité des PEs en santé humaine.

Mots clés : 17-beta hydroxystéroïde déshydrogénase, aromatase, corrélations *in vitro*/*in vivo*, évaluation intégrative, méthodes alternatives, perturbateurs endocriniens, stéroïdogénèse

Contact: nadia.quignot@ineris.fr

Réactivité cellulaire et nanoparticules inorganiques (CdS, TiO₂, ZnO) : Etude sur cellules rénales en culture

¹Pujalté I, ¹Passagne I, ²Daculsi R, ³Tréguer M, ²Brouillaud B, ²Rémy M, ¹Barron E,
¹Ohayon-Courtès C, ¹L'Azou B

¹EA 3672 Santé - Travail - Environnement, Université Victor Segalen - Bordeaux. 146 rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France ; ²INSERM U577, Biomatériaux et Réparation Tissulaire, Université de Bordeaux, 146 rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France ; ³ICMCB - Université Bordeaux1 UPR 9048 87 avenue du Dr A. Schweitzer, 33608 Pessac, France

De nombreuses études suggèrent que les propriétés physico-chimiques des nanoparticules (NPs) (taille, granulométrie, charge, composition mais aussi solubilité) conditionnent leur toxicité et leur réactivité cellulaire. Cependant, de nombreuses incertitudes persistent sur la toxicité potentielle des NPs et leur devenir dans l'organisme

L'objectif de ce travail est de mieux comprendre les mécanismes cytotoxiques induits par des NPs inorganiques sur une cible secondaire représentée par le rein. En effet, les NPs sont susceptibles de franchir les barrières cellulaires, être véhiculées par la circulation sanguine pour se retrouver filtrées par le rein au niveau des cellules mésangiales glomérulaires et peut être, réabsorbées au niveau des cellules proximales de l'épithélium tubulaire.

Les études sont réalisées avec des NPs de titane (TiO₂:15nm), de zinc (ZnO:<100 nm) et de cadmium (CdS, 10nm), versus des micro-particules de même composition, sur cellules mésangiales, IP15 et cellules proximales tubulaires, HK-2.

Les résultats montrent des effets variables selon la nature du métal et, à composition comparable, selon la taille et la solubilité des NPs. La toxicité des NPs de CdS et de Zn est étroitement liée à leur solubilité. A l'inverse, le TiO₂ ne montre pas de toxicité importante (CI₅₀>100µg/cm²) probablement de par son insolubilité. Il est observé, en complément, des sensibilités différentes selon le modèle cellulaire étudié. Une augmentation de la production d'espèces radicalaires de l'oxygène (ROS) et une perturbation de la balance oxydative (GSH/GSSG) cellulaire sont associés aux effets cytotoxiques obtenus. Une approche moléculaire permet ensuite, d'identifier les voies de signalisation intervenant dans la réponse au stress tel que le facteur de transcription Nf-κb ainsi que des enzymes anti-oxydantes pour mieux comprendre les mécanismes de défense cellulaire.

Cette étude est financée par l'AFSSET (Programme Santé-Environnement/Santé-Travail n°EST-2007-22)) afssset .)

***Etude des mécanismes de toxicité et d'accumulation
des nanoparticules de silice (SiO₂) sur l'épithélium rénal***

¹Cécile Apolit, ¹Béatrice L'Azou, ¹Marie Morille, ¹Igor Pujalté, ²Aurélien Auger, ¹Jean Cambar.

¹Isabelle Passagne

¹EA 3672 Santé - Travail - Environnement, Université Victor Segalen - Bordeaux 2,
146 rue Léo-Saignat, F33076 Bordeaux Cedex, France

²CEA Grenoble, Laboratoire de Chimie et de Sécurité des Nanomatériaux, 17 rue des Martyrs, 38054
Grenoble Cedex 9, France

La production des nanoparticules de dioxyde de silicium (SiO₂) étant en augmentation, l'évaluation de leur impact biologique s'avère nécessaire. Après translocation à travers la barrière épithéliale pulmonaire, les nanoparticules peuvent se distribuer dans l'organisme et exercer une réactivité biologique au niveau de certains organes induisant des désordres physiologiques. Le rein, organe d'élimination, pourrait être une cible ; d'autant que la filtration glomérulaire est un processus taille-dépendant.

Le but de cette étude est d'évaluer *in vitro*, les effets toxiques induits au niveau rénal et d'appréhender les mécanismes de pénétration, à l'origine de l'accumulation intracellulaire des nanoparticules. La cible rénale choisie est la cellule épithéliale tubulaire proximale d'origine humaine (HK-2) et porcine (LLC-PK1), exposée pendant 24h à des nanoparticules de tailles différentes (100 et 20nm), marquées ou non avec un groupement fluorescent de type rhodamine ou porphyrine. La réalisation du test WST-1 a permis de montrer que les nanoparticules SiO₂ -20nm sont plus toxiques que celles de 100nm, effets observés, cependant, à concentrations importantes (>100µg/ml). La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) n'est pas significativement augmentée après exposition aux nanoparticules. Les niveaux d'expression génique (RT-PCR) de certains marqueurs anti-oxydants, comme la catalase, sont néanmoins augmentés d'un facteur 3, traduisant une adaptation cellulaire. Parallèlement, l'étude de l'internalisation des SiO₂ a été effectuée par cytométrie en flux. Afin de caractériser la voie de pénétration, des inhibiteurs spécifiques des voies d'endocytose ont été utilisés. Les résultats préliminaires suggèrent une cinétique d'endocytose relativement lente, aucun plateau n'étant observé après 24h d'incubation. L'utilisation des inhibiteurs semble indiquer une internalisation majoritairement par macropinocytose ainsi que par endocytose médiée par les molécules de clathrine pour les nanoparticules de 100nm. Dans le cas des nanoparticules de 20nm, les mécanismes impliqués restent encore à explorer.

Cette étude est financée dans le cadre du programme 189 du MEEDDM pôle applicatif en toxicologie (INERIS, NANOTRANS SJA-09-1080042).

Mesure d'impédance cellulaire en temps réel, un nouvel outil en pharmacotoxicologie prédictive ?

Sylvie Barcellini-Couget ^{1,2}, Georges de Sousa ², Nathalie Zucchini ², Roger Rahmani ²

¹ Neoamh-RT, ² Laboratoire de Toxicologie Cellulaire, Moléculaire et Génomique - U1089
Institut de Recherches INRA, Sophia Antipolis, France

La mesure de la mortalité cellulaire en réponse à un stress chimique est le passage obligé de toute évaluation pharmacotoxicologique réglementaire. Elle fournit des informations essentielles quant à l'effet biologique d'une molécule ou d'un cocktail de produits et oriente vers les substances les plus acceptables en termes d'effets indésirables. Les analyses classiques reposent cependant sur des expérimentations spécifiquement dédiées et effectuées à des temps déterminés. Nous avons, dans ce cadre, évalué le potentiel d'un système d'analyse cellulaire alternatif permettant de suivre, en temps réel, l'état biologique et fonctionnel de cellules adhérentes. Basées sur une mesure d'impédance électrique, sans marquage, ni coloration préalable, les mesures se font alors dans un contexte non invasif. Cette technologie permet de suivre les modifications cyto-morphologiques tant précoces que tardives, et d'obtenir une quantité d'informations inégalée lors de mesures en point final.

Dans les travaux présentés, nous montrons l'intérêt de cet outil d'investigation dans différents domaines de la toxicologie : - Etude de cytotoxicité et de bioactivation - Identification de composés cytoprotecteurs - Caractérisation d'interactions toxicologiques environnementales - Evaluation de la prolifération et de la motilité cellulaire... Tout en générant des données cinétiques particulièrement pertinentes et informatives, cette méthode d'analyse innovante accroît la sensibilité des tests. De plus, la possibilité de pouvoir déterminer avec précision le moment de déclenchement d'un événement cellulaire donné, en réponse à une exposition, constitue un atout considérable pour la compréhension des mécanismes d'action pharmaco-toxicologiques. Enfin, cet outil rend envisageable l'identification de signatures biologiques multiparamétriques, permettant de classer les composés par familles, selon leur profil d'impédance et leur mode d'action pharmaco-toxicologique.

La mesure d'impédance représente ainsi une technologie prometteuse, ayant toute sa place dans l'arsenal des outils modernes de la toxicologie explicative et prédictive.

Remerciements : Galderma R&D, Sophia Antipolis, France - Roche Diagnostics, Meylan, France

R. Rasoanandrasana, A. Divetain, N. Auzeil, F. Massicot *, O. Laprévote

Laboratoire de Chimie-Toxicologie analytique et cellulaire, EA4463, Faculté de Pharmacie,
Université Paris Descartes, 75006 Paris, France

*: france.massicot@parisdescartes.fr

La maladie d'Alzheimer (MA) est une atteinte neurodégénérative caractérisée par l'installation progressive d'une démence sénile, l'apparition de plaques amyloïdes et d'une phosphorylation anormale de la protéine Tau à l'origine de la dégénérescence neuronale. Ces phénomènes contribuent à une neuroinflammation dont les mécanismes moléculaires et systémiques sont encore mal connus. Le développement de nouveaux modèles animaux est donc nécessaire à leur compréhension. L'impact d'une infection systémique sur le cerveau a été mis en évidence chez des rats adultes traités par des doses répétées de LPS à 1mg/kg/semaine pendant 8 semaines.

Les effets du LPS sur la mémorisation spatiale ont été évalués à l'aide du test du labyrinthe en Y. Les effets sur le stress oxydant et sur l'inflammation ont été déterminés par la mesure de la production d'espèces radicalaires de l'oxygène, la libération de NO, le contenu en glutathion ainsi que l'activité, la masse et le potentiel d'oxydoréduction mitochondrial, à l'aide de sondes fluorescentes ou non. Enfin, l'activité cholinestérasique a été évaluée au niveau du mésencéphale.

Nous avons montré qu'une inflammation périphérique répétée, peut induire un stress oxydant, une neuroinflammation et des perturbations du comportement. Ces résultats permettent de conforter l'hypothèse que des infections répétées au cours de la vie, pourraient induire une neurodégénérescence à l'origine d'un déficit cholinergique. D'autres atteintes caractéristiques de la MA, notamment la formation de dépôts amyloïdes et de neurofibrilles sont à l'étude.

France MASSICOT^{1*}, Ludivine DAVID¹, Dominique CHEN¹, Olivier LAPREVOTE¹, François COUDORE²

¹ Laboratoire de Chimie-Toxicologie analytique et cellulaire, EA4463, Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, 75006 Paris, France

² Laboratoire de NeuroPharmacologie, EA3544, Faculté de Pharmacie, Université Paris Sud 11, 92296 Chatenay-Malabry, France.

* france.massicot@parisdescartes.fr

L'oxaliplatine (OXA), anticancéreux largement utilisé dans le traitement des cancers du colon, déclenche une neuropathie douloureuse observée chez 70 à 80% des patients traités, ce qui altère gravement la qualité de vie du patient et peut aboutir à baisser la posologie. Chez l'animal, l'OXA induirait une atteinte des neurones des ganglions sensitifs de la racine dorsale de la moelle.

Les effets de l'oxaliplatine (2-200 μ M) sur le stress oxydant et sur l'inflammation ont été évalués sur des cellules neuronales SHSY5Y en mesurant la production d'espèces radicalaires de l'oxygène, l'activation des récepteurs P2X7, ainsi qu'au niveau mitochondrial, l'activité, la masse et le potentiel d'oxydoréduction, à l'aide de sondes fluorescentes.

Dans les cellules SHSY5Y, l'oxaliplatine induit un stress oxydant avec une production d'espèces réactives de l'oxygène et d'anions superoxydes (150% à 340%, respectivement) et une altération du fonctionnement mitochondrial (dépolariation) pouvant jouer un rôle important dans la genèse et la transmission de la douleur neuropathique liée à l'OXA.

L'OXA provoque aussi une activation des récepteurs P2X7 (70% à 400%), ce qui suggère une implication de ces récepteurs dans les mécanismes de neurotoxicité et pourrait fournir une nouvelle cible d'action thérapeutique de la douleur neuropathique provoquée par l'OXA.

France MASSICOT*, Anne Poulizac, Bérangère de Moucheron, Mélody Dutot, Olivier Laprèvote, Patrice Rat

Laboratoire de Chimie-Toxicologie analytique et cellulaire EA4463, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes, 4 Avenue de l'Observatoire, 75006 Paris

* france.massicot@parisdescartes.fr

La Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA) est une maladie dégénérative touchant l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) et la rétine neurosensorielle. Elle se traduit par une déstructuration de l'EPR, l'atrophie des cellules photoréceptrices, et la formation au niveau de la rétine de drusens (dépôts lipidiques). Récemment, le peptide β -amyloïde, mis en cause dans la maladie d'Alzheimer, a été retrouvé dans les drusens rétiens de patients atteints de DMLA. Notre objectif est de mieux comprendre les mécanismes cytotoxiques induit par le β -amyloïde.

Nous avons comparé les effets de l'amyloïde β (1-42) sous forme oligomérisée OA β (1-42) sur des cellules humaines de l'épithélium rétinien pigmentaire (lignée ARPE-19) et des cellules macrogliales de Müller (lignée MIO-M1).

OA β (1-42) qui provoque une altération de la viabilité cellulaire et une surproduction radicalaire induit un dommage de l'épithélium rétinien.

OA β (1-42) induit aussi un dysfonctionnement mitochondrial révélé par une altération de la masse et du potentiel transmembranaire. En outre, nous constatons une activation des récepteurs de mort et de dégénérescence P2X7 et un phénomène d'apoptose.

Les effets cellulaires, et en particulier l'apoptose, semblent plus importants dans les cellules macrogliales MIO-M1 que dans les cellules rétiennes ARPE-19. Les cellules macrogliales de Müller pourraient donc jouer un rôle majeur dans la dégénérescence cellulaire.

Par ailleurs, l'activation des récepteurs P2X7 qui suggère l'implication de ces derniers dans les mécanismes de neurotoxicité du peptide amyloïde sous forme oligomérisée, pourrait être une nouvelle cible d'action thérapeutique de la DMLA.

Analyse lipidomique du cerveau de rats traités par le lipopolysaccharide : apport à l'étude de la maladie d'Alzheimer

M. Gaudin, A. Abdel Jaoued, F. Massicot, N. Auzeil* et O. Laprévotte

Laboratoire de Chimie-Toxicologie, EA4463, Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes,
75006 Paris, France

*: nicolas.auzeil@parisdescartes.fr

La maladie d'Alzheimer (MA) se caractérise par l'installation progressive d'une démence sénile, par l'apparition de plaques amyloïdes, d'une hyperphosphorylation de la protéine Tau et de pertes neuronales. L'origine et la succession des événements pathologiques aboutissant aux symptômes de la MA sont mal connues. Le développement de modèles animaux est nécessaire à la compréhension de la pathogenèse de la MA, et aussi à la recherche de biomarqueurs et à de nouveaux traitements. Nous avons montré que des rats traités par du lipopolysaccharide (LPS) présentent une inflammation cérébrale associée à un stress oxydant à l'origine d'un déficit mnésique ; il s'agit donc d'un modèle potentiel d'étude de la MA. Cette maladie est aussi caractérisée par une altération de la composition et du métabolisme lipidique, notamment un déficit cérébral en plasmalogènes et sulfatides ainsi qu'une élévation des céramides. De plus le taux plasmatique de sphingomyélines et de céramides serait un indicateur précoce de la progression de la MA. Afin d'établir le profil lipidique cérébral des rats traités par du LPS, nous présentons une méthode d'analyse comprenant l'extraction des lipides totaux à partir de coupes de cerveau et leur identification par couplage chromatographie liquide - spectrométrie de masse. L'analyse par spectrométrie de masse est fondée sur une approche "semi-globale" avec sélection d'une séquence de fragmentation caractéristique des six groupes de lipides suivants : phosphatidylcholines et sphingomyélines, phosphatidyléthanolamines, phosphatidylsérines, céramides, et phosphatidylinositols. Cette approche permet non seulement l'identification mais aussi leur quantification. Les résultats préliminaires obtenus chez le rat sain présentés ici seront comparés à ceux des rats traités par du LPS. Grâce à une analyse statistique multivariée, cette étude devrait permettre d'identifier les modifications du lipidome cérébral.

GLAUCOME ET APOPTOSE DES CELLULES TRABECULAIRES SOUS L'EFFET DU CHLORURE DE BENZALKONIUM, UN CONSERVATEUR DES TRAITEMENTS ANTIGLAUCOMATEUX

E. Warcoin^{1,2}, D. Godefroy¹, C. Clouzeau^{1,2}, A. Grise¹, C. Baudouin^{1,3}, F. Brignole-Baudouin^{1,2}.

¹INSERM UMRS 968, Institut de la Vision, Paris, France; ²Université Paris Descartes, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Laboratoire de Toxicologie, Paris, France; ³Centre National Hospitalier d'Ophthalmologie, Quinze-Vingts, Paris, France.

Introduction : Le glaucome, 2^{ème} cause de cécité dans le monde, est du à une altération du trabéculum. Les patients sont traités avec des traitements locaux contenant du chlorure de benzalkonium (BAC) comme conservateur. Sa toxicité a été largement démontrée sur la conjonctive (apoptose, inflammation, fibrose) alors qu'elle a été peu étudiée sur le réseau trabéculaire au cœur de la pathologie. Notre objectif a été d'étudier la toxicité du BAC in vitro sur les cellules trabéculaires.

Méthodes : Des cellules HTM3 (Human Trabecular Meshwork cells) ont été stimulées avec différentes concentrations de BAC pendant 15min suivies de 24h de récupération. L'effet toxique a été exploré en microtitration fluorimétrique sur cellules vivantes avec des tests de viabilité cellulaire (Rouge Neutre, Alamar Blue), et d'apoptose (YO-PRO-1, Hoechst 33342). L'apoptose a été explorée aussi en cytométrie en flux (CMF) grâce aux marquages de l'Annexine V - 7AAD, du pic d'ADN hypoploïde et du couple Bax/Bcl2. L'expression de la caspase 3 activée a été explorée en microscopie confocale.

Résultats: Le BAC a diminué la viabilité cellulaire de façon concentration-dépendante avec une CL 50 de 0,005% ainsi qu'une viabilité inférieure à 10% pour la concentration à 0,01%. Il a induit une apoptose de 70% pour la concentration de 0,005% et de 90% pour celle de 0,01%. Ces résultats ont été confirmés par les tests d'apoptose en microtitration fluorimétrique, et par l'effondrement de Bcl2 de plus de 90% pour la concentration de 0,01% ainsi que l'hyperexpression de la caspase 3 activée.

Conclusions: Cette étude confirme que l'apoptose des cellules trabéculaires peut être induite par de faibles concentrations de BAC. Cette mort cellulaire pourrait jouer un rôle non négligeable dans l'évolution du glaucome compte tenu du rôle clé du réseau trabéculaire dans cette pathologie. C'est pourquoi, ses conséquences en termes d'inflammation et de remodelage tissulaire méritent d'être étudiées.

Interactions of titanium dioxide and silica nanoparticles with the epithelial barrier of the airways

S.Vranic, R.Guadagnini, A.Baeza, M. C.Borot, K. Moreau, S.Hussain, F.Marano and S.Boland

Unit of Functional and Adaptive Biology (BFA) CNRS EAC 4413, Laboratory of Molecular and Cellular Responses to Xenobiotics, University Paris Diderot - Paris 7, CC 7073, 75205 Paris cedex 13, France

boland@univ-paris-diderot.fr

In view of the considerable development of nanotechnologies it is important to evaluate their risk for human health. Our goal was to study the endocytosis of NPs by respiratory epithelial cells, the first target after inhalation of NPs, and their capacity to cross the epithelial barrier. We investigated the effects of different NP (TiO_2 and SiO_2) on human respiratory epithelial cells (16HBE14O, Calu-3 and NCI-H292).

Beforehand we determined non cytotoxic concentrations of NPs by WST-1 assay showing that TiO_2 NPs are only cytotoxic at very high concentrations.

We evaluated quantitatively and qualitatively the endocytosis of these NPs by flow cytometry and confocal microscopy revealing their ability to enter respiratory epithelial cells. We studied three major endocytotic pathways (clathrin dependent, caveolin dependent or macropinocytosis) using specific inhibitors for each pathway after evaluating their specificity and efficiency. TiO_2 NPs are internalized by respiratory epithelial cells using predominantly clathrin dependent cellular machinery, but we have shown a poor specificity of the inhibitors used.

Firstly we compared the capacity of different cell lines to develop a tight epithelial layer by measuring the transepithelial electrical resistance (TEER) and regarding by confocal microscopy the expression of tight junction proteins. Afterwards we quantified the NPs which pass through the epithelial layer demonstrating that the percentage of TiO_2 NPs crossing the epithelium is very low.

In conclusion, TiO_2 and SiO_2 NPs are only cytotoxic at very high concentrations. They are taken up by respiratory epithelial cells and have the capacity to cross the epithelial barrier by transcytosis.

This work was supported by grant from EC FP7 201335 (Nanotest) EC FP7 228789 (ENPRA) and National Grant Nanotrans

Recherche d'un biomarqueur par toxicogénomique : exemple de l'uranium

Prat Odette ^a, Ansoborlo Eric ^b, Sage Nicole ^a, Cavadore Didier ^c, Lecoix Josseline ^c, Quémeneur Eric ^a

a CEA, IBEB, SBTN, LEPC, F-30207 Bagnols-sur-Cèze, France

b CEA, DEN, DRCP, CETAMA, F-30207 Bagnols-sur-Cèze, France

c CEA, DEN, DUSP, LABM, F-30207 Bagnols-sur-Cèze, France

Ce travail illustre l'utilisation d'un outil « omics » pour la recherche d'un possible biomarqueur des effets rénaux de l'uranium. Le degré d'exposition des travailleurs du nucléaire est suivi à l'heure actuelle par le dosage urinaire de l'uranium. Toutefois un marqueur urinaire de dommage interne aux reins causé par l'uranium fait toujours défaut à la médecine du travail en milieu nucléaire, en dehors des marqueurs classiques d'atteinte rénale. Dans un premier temps un travail *in vitro* a permis d'analyser le transcriptome différentiel de cellules humaines rénales exposées à du carbonate d'uranium par rapport à des cellules non exposées. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence un gène *SPP1* dont l'expression, validée par qRT-PCR, est réprimée en cas d'exposition aiguë des cellules à l'uranium. La protéine correspondante, l'ostéopontine, qui est une protéine sécrétée, a été dosée par immunoessai dans les surnageants de culture et s'est avérée dose et temps-dépendante vis-à-vis de l'uranium. L'ostéopontine est normalement présente dans l'urine ou elle prend le nom d'uroponine et cette protéine est liée à la minéralisation ectopique des métaux dans les tissus mous. Nous avons alors vérifié sur une cohorte de personnes professionnellement exposées à de l'uranium ainsi que sur une cohorte de personnes exposées chroniquement via l'eau de boisson que ce paramètre était modifié selon le taux d'uranium contenu dans leur urine. Malgré un nombre de cas restreint, une diminution significative du taux de cette protéine intervient pour des taux urinaires supérieurs à 30 microgrammes /L d'uranium, ce qui correspond à un taux généralement admis d'atteinte chimique interne par l'uranium. Il est donc possible de mesurer ce paramètre de façon non invasive dans l'urine et un mécanisme de régulation interne de minéralisation de l'uranium par cette protéine est plausible. Même si ce paramètre ne répond pas aux critères d'un bon biomarqueur en raison d'une variabilité interindividuelle très élevée, cet exemple démontre néanmoins l'intérêt de l'utilisation de la toxicogénomique pour la recherche de marqueurs de toxicité.

Corresponding author

Odette Prat

CEA, IBEB, SBTN, LEPC,

F-30207 Bagnols-sur-Cèze, France.

E-mail address: odette.prat@cea.fr

Phone number +33 (0) 4 66 79 19 14

Fax number +33 (0) 4 66 79 19 05

Premières applications en Toxicologie de l'imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS

Olivier Laprévôte^{1,2}

¹ Chimie-Toxicologie Analytique et Cellulaire, EA 4463, Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, 4, avenue de l'Observatoire, 75 006 Paris, France

² Centre de Recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles, UPR CNRS 2301, avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette cedex

L'imagerie par spectrométrie de masse est une technique relativement récente qui a tiré parti du développement de sources d'ions grâce auxquelles l'énergie d'ionisation est transmise localement à l'échantillon à l'aide de faisceaux focalisés. L'exemple typique en est le mode d'ionisation MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation*) où un faisceau laser irradie l'échantillon sur une surface de l'ordre de 50 microns. Pour notre part, à l'aide de développements instrumentaux appropriés, nous avons montré qu'un bombardement d'un échantillon par des ions primaires *Ad Hoc* permettait d'obtenir des spectres de masse à partir de surfaces de l'ordre du micromètre carré.^{1,2}

Dès lors, l'enregistrement de spectres de masse en des points régulièrement espacés à la surface d'un échantillon biologique permet de relier l'intensité des signaux ioniques des différentes molécules à leur localisation. Une simple conversion des valeurs d'intensité en code couleur conduit à l'obtention d'images. La force de la technique réside dans le fait que, virtuellement, toute molécule ionisable présente à la surface de l'échantillon peut être localisée ce qui fournit autant d'images moléculaires que de pics présents sur les spectres de masse (plusieurs dizaines voire centaines en une seule acquisition). La résolution spatiale, de l'ordre du micromètre est par ailleurs pertinente pour toute étude qui ne nécessite pas d'analyse à l'échelle subcellulaire.

L'information essentielle issue d'une expérience d'imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS sur des coupes tissulaires consiste donc *in fine* à l'identification et à la localisation d'un ensemble de molécules à leurs surfaces.

Cette approche sera illustrée par les premiers exemples de son application dans le domaine de la Toxicologie. Nous montrerons que la spectrométrie de masse TOF-SIMS permet de localiser des drogues dans les tissus sans recourir aux produits radiomarqués, de lier la répartition tissulaire de xénobiotiques à certaines maladies d'origine toxiques et enfin de révéler des mécanismes sous-jacents à l'apparition de pathologies particulières.

1. D. Touboul, F. Halgand, A. Brunelle, R. Kersting, E. Tallarek, B. Hagenhoff, O. Laprévôte; Tissue Molecular Ion Imaging by Gold Cluster Ion Bombardment. *Anal. Chem.*, **76**, 1550-1559 (2004).
2. A. Brunelle, O. Laprévôte; Recent Advances in Biological Tissue Imaging with Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry: Polyatomic Ion Sources, Sample Preparation, and Applications. *Current Pharm. Design*, **13**, 3335-3343 (2007)

L'Imagerie du petit animal, un outil pour la toxicologie prédictive

Alain Le Pape, DR-CNRS

INSERM U618, Université de Tours

CNRS, Centre d'Imagerie du Petit Animal, CIPA-TAAM, UPS n°44, Orléans

lepape@med.univ-tours.fr, <http://transgenose.cnrs-orleans.fr/cipa/>

A partir des modalités de l'imagerie médicale, des évolutions technologiques majeures ont conduit à la conception d'imageurs dont la résolution et la sensibilité permettent désormais de réaliser chez la souris des examens de performances pratiquement comparables à ceux pratiqués en médecine par TDM X (scanner), IRM, ultrasons et imagerie nucléaire incluant la scintigraphie (SPECT) et la Tomographie par **Emission** de Positons (TEP).

Cette palette de ressources complémentaires, le plus souvent exploitées en imagerie multimodalités pour confronter des informations anatomiques, physiologiques et moléculaires a été complétée plus récemment par la biophotonique avec la bioluminescence et la fluorescence infra rouge dont les applications vont s'étendre considérablement pour l'imagerie moléculaire et d'expression des gènes.

Ces modalités d'exploration in vivo qui se sont imposées pour l'innovation pharmaceutique sont désormais au cœur des stratégies de recherche translationnelle et constituent une ressource potentielle pour plusieurs domaines de la toxicologie.

L'imagerie de la biodistribution et son exploitation pharmacocinétique permet une identification rapide des organes cibles toxicologiques sur un faible nombre d'animaux, de manière strictement non invasive et de mise en œuvre aisée pour évaluer une éventuelle dépendance vis-à-vis de l'espèce. Par l'imagerie moléculaire, une identification rapide des processus physiopathologiques impliqués peut être réalisée chez toutes les espèces animales pertinentes, des rongeurs conventionnels aux primates, avec le recours aux souris génétiquement modifiées dont les modèles transgéniques bioluminescents sous la dépendance d'un promoteur spécifique, pour les études mécanistiques.

Le potentiel et les limites de l'imagerie pour la toxicologie prédictive sera discuté à partir de plusieurs exemples d'applications menées dans différentes espèces :

- toxicité pulmonaire, pertinence de l'espèce et détection d'une induction de macrophages intravasculaires,
- toxicité rénale : implication de la mégaline et de la cubiline des tubules proximaux,
- nouvelles approches de l'immuno-toxicité par imagerie moléculaire.