
Méthodes d'étude des xénobiotiques

1. définition xénobiotique

Un xénobiotique est une substance étrangère à l'organisme, qu'elle soit d'origine médicamenteuse, agricole, industrielle, alimentaire ou environnementale. Il peut pénétrer par voie orale, respiratoire, cutanée ou parentérale.

Les conséquences biologiques dépendent de la substance, de la dose, de la durée d'exposition, des caractéristiques de l'individu et du niveau d'exposition interne.

2. Approche Toxicologie moderne

Historiquement dominée par l'expérimentation animale, la toxicologie contemporaine s'oriente vers une intégration croissante des trois approches, dans une logique de complémentarité plutôt que de substitution pure : les données *in silico* orientent le choix des tests *in vitro* à réaliser en priorité ; les résultats *in vitro* permettent de cribler rapidement un grand nombre de substances et d'orienter les études *in vivo*, désormais réservées aux questions ne pouvant être résolues autrement (toxicocinétique complexe, effets systémiques intégrés, cancérogénicité à long terme).

2.1. Les approches *in vivo*

Les approches *in vivo* consistent à administrer le xénobiotique à un organisme entier (le plus souvent un modèle animal) et à observer les effets biologiques, physiologiques et comportementaux qui en résultent. Elles demeurent, malgré les développements des méthodes alternatives, la référence pour l'évaluation d'effets systémiques complexes impliquant l'intégration de plusieurs organes et systèmes physiologiques.

2.2. Principaux modèles animaux utilisés

- **Rat (*Rattus norvegicus*)** : Espèce de référence pour la majorité des études réglementaires (toxicité aiguë, subchronique, chronique, cancérogénicité, reproduction)
- **Souris (*Mus musculus*)** : Études de génotoxicité, immunotoxicité, modèles génétiquement modifiés (knock-out, knock-in), cancérogénicité
- **Lapin** : Études de toxicité pour le développement (tératogénicité), irritation cutanée et oculaire
- **Chien, primate non humain** : Études de toxicologie non rongeur exigées pour certains dossiers pharmaceutiques (deuxième espèce)
- **Poisson-zèbre (*Danio rerio*)** : Modèle émergent à mi-chemin *in vivo*/alternatif : développement rapide, transparence embryonnaire, criblage à haut débit, réduction du nombre d'animaux utilisés

2.3 Voies d'administration expérimentales

- **Voie orale (gavage, alimentation, eau de boisson)** : reproduit l'exposition alimentaire humaine, voie la plus couramment utilisée.
- **Voie cutanée** : pertinente pour les cosmétiques, produits phytopharmaceutiques, substances à usage professionnel.
- **Voie respiratoire (inhalation)** : nécessaire pour l'évaluation des polluants atmosphériques et des expositions professionnelles par inhalation.

- **Voies parentérales (intraveineuse, intrapéritonéale, sous-cutanée) :** utilisées principalement en pharmacologie et en recherche mécanistique, plus rarement en toxicologie réglementaire de l'exposition environnementale.

2.4 Avantages et limites des approches in vivo

Avantages	Limites
Intégration de l'ensemble des systèmes physiologiques (interactions entre organes, système immunitaire, système nerveux)	Coût élevé, durée longue des protocoles (jusqu'à plusieurs années pour la cancérogénicité)
Prise en compte du métabolisme complet et de la toxicocinétique réelle de la substance	Questions éthiques majeures et cadre réglementaire de plus en plus restrictif (principe des 3R)
Référence historique pour l'établissement des VTR (NOAEL, LOAEL)	Incertitude liée à l'extrapolation inter-espèces (différences toxicocinétiques et toxicodynamiques)
Seule approche permettant d'observer certains effets comportementaux ou neurologiques complexes	Variabilité interindividuelle au sein même de l'espèce animale testée, effectifs limités par échantillon

3. Les approches in vitro

Les approches in vitro reposent sur l'utilisation de systèmes biologiques isolés — cellules, tissus, organes ou fractions subcellulaires maintenus en culture en dehors de l'organisme — pour étudier les effets d'un xénobiotique dans des conditions expérimentales contrôlées, reproductibles et permettant un criblage à plus haut débit que les études in vivo.

3.1 Principaux modèles cellulaires utilisés

- **Lignées cellulaires immortalisées :** HepG2 (hépatocytes humains, modèle de référence en toxicologie hépatique), Caco-2 (modèle d'absorption intestinale), HEK293, cellules CHO — faciles à cultiver et à standardiser, mais souvent éloignées phénotypiquement des cellules primaires.
- **Cultures primaires :** hépatocytes humains ou animaux fraîchement isolés, plus représentatifs de la physiologie native mais de disponibilité limitée et de durée de culture restreinte.
- **Tissus reconstruits :** épidermes humains reconstruits (par exemple EpiSkin®, EpiDerm®), validés par les autorités réglementaires pour remplacer les tests d'irritation cutanée historiquement réalisés sur le lapin (test de Draize).

3.2 Principaux types de tests in vitro

Test	Principe et finalité
Cytotoxicité (MTT, résazurine, rouge neutre)	Évaluer la viabilité cellulaire après exposition et déterminer la CE50.
Test d'Ames	Détecter les mutations génétiques chez <i>Salmonella typhimurium</i> , avec ou sans activation métabolique (S9).
Test du micronoyau	Détecter les anomalies chromosomiques (fragments ou chromosomes entiers).
Test des comètes	Détecter les cassures de l'ADN par électrophorèse sur cellule unique.

Perturbation endocrinienne (ER/AR CALUX)	Détecter l'activité agoniste ou antagoniste des substances sur les récepteurs hormonaux.
---	--

3.3 Avantages et limites des approches in vitro

Avantages	Limites
Criblage rapide et à haut débit d'un grand nombre de substances, coût réduit par rapport à l'in vivo	Absence d'intégration systémique (pas de prise en compte des interactions entre organes)
Réduction et remplacement de l'expérimentation animale (principe des 3R)	Capacité métabolique souvent limitée ou différente de celle de l'organisme entier (nécessité d'ajouter des systèmes d'activation métabolique exogènes, comme la fraction S9)
Meilleure standardisation et reproductibilité expérimentale	Difficulté à extrapoler une concentration active in vitro vers une dose active in vivo (extrapolation in vitro-in vivo, IVIVE)
Possibilité d'étudier des cellules humaines directement, réduisant l'incertitude d'extrapolation inter-espèces	Validation réglementaire encore partielle pour certains tests complexes (effets systémiques, cancérogénicité à long terme)

4. Les approches in silico

Les approches in silico regroupent l'ensemble des méthodes de modélisation informatique, statistique et mathématique permettant de prédire les propriétés toxicologiques d'une substance, ou de modéliser son devenir dans l'organisme, sans recourir à l'expérimentation directe.

4.1 Modélisation de la relation structure-activité

- QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) : établissement d'un modèle mathématique reliant des descripteurs de la structure chimique d'une molécule (poids moléculaire, lipophilie, présence de groupements fonctionnels réactifs) à une propriété toxicologique mesurée sur un ensemble de substances de référence, permettant de prédire cette propriété pour de nouvelles molécules non testées expérimentalement.
- Read-across (lecture croisée) : extrapolation des propriétés toxicologiques d'une substance à partir de celles de substances structurellement proches et partageant un mécanisme d'action supposé commun, notamment utilisée dans le cadre réglementaire REACH pour limiter les tests animaux.
- Modélisation moléculaire et docking : simulation de l'interaction tridimensionnelle entre une molécule et sa cible biologique potentielle (récepteur, enzyme), permettant de prédire une activité biologique ou toxique sur une base mécanistique.

4.2 Modélisation toxicocinétique

- Modèles PBPK (Physiologically Based Pharmacokinetic) : modèles compartimentaux représentant les principaux organes et tissus de l'organisme, reliés entre eux par les flux sanguins réels, permettant de simuler l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion d'une substance et d'extrapoler entre espèces, entre voies d'exposition, ou entre scénarios de dose.

- Modèles toxicodynamiques couplés aux modèles toxicocinétiques (PBPK/TD), permettant de relier la concentration prédite au site d'action à l'intensité de l'effet biologique observé.

5. Approches intégrées (IATA) et principe des 3R

Face à la multiplication des méthodes disponibles, la toxicologie réglementaire contemporaine promeut des approches intégrées d'évaluation et de test (IATA, Integrated Approaches to Testing and Assessment), combinant de façon hiérarchisée et raisonnée les données *in silico*, *in vitro* et *in vivo* disponibles pour répondre à une question toxicologique donnée, en ne recourant à l'expérimentation animale qu'en dernier ressort, lorsque les autres approches ne permettent pas de conclure avec un niveau de confiance suffisant.

La stratégie IATA repose généralement sur une logique par paliers (tiered testing strategy) : les méthodes les moins coûteuses et les plus rapides (*in silico*, puis *in vitro*) sont mobilisées en premier lieu ; les études *in vivo* ne sont engagées que pour les questions résiduelles ne pouvant être résolues par les étapes précédentes, ou lorsque la réglementation l'exige explicitement (par exemple pour certains dossiers d'autorisation de mise sur le marché de médicaments ou de produits phytopharmaceutiques).

6. Suivi des biomarqueurs de toxicité

Un biomarqueur est une molécule, un paramètre ou une caractéristique biologique mesurable permettant d'évaluer un état physiologique, une exposition à une substance ou une réponse de l'organisme à un agent toxique.

En toxicologie, il permet d'identifier une exposition, de détecter un effet toxique ou d'évaluer la susceptibilité individuelle.

6.1 Les trois grandes catégories de biomarqueurs

Catégorie	Définition	Exemples
Biomarqueur d'exposition	Indicateur mesurable reflétant l'exposition réelle à une substance toxique.	Plombémie, cotinine urinaire, adduits à l'ADN.
Biomarqueur d'effet	Modification biologique mesurable indiquant un effet toxique potentiel ou avéré.	Acétylcholinestérase, transaminases (ALT/AST), micronoyaux.
Biomarqueur de susceptibilité	Indicateur de la sensibilité individuelle à une substance, souvent lié à des facteurs génétiques.	Polymorphismes CYP2D6, CYP2C19 et NAT2.

6.2 Biomarqueurs biochimiques classiques utilisés en toxicologie clinique

- **Fonction hépatique** : alanine aminotransférase (ALAT) et aspartate aminotransférase (ASAT), marqueurs de cytolysé hépatocytaire ; gamma-glutamyltransférase (GGT) et phosphatases alcalines, marqueurs de cholestase ; bilirubine.
- **Fonction rénale** : créatininémie et débit de filtration glomérulaire estimé, urée, protéinurie, marqueurs plus précoces tels que la NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin) ou la KIM-1 (Kidney Injury Molecule-1).

- **Toxicité neurologique** : activité de l'acétylcholinestérase érythrocytaire et plasmatique (exposition aux organophosphorés et carbamates), protéine S100B (marqueur de lésion du système nerveux central).
- **Toxicité hématologique** : numération formule sanguine, dosage de la delta-aminolévulinate déshydratase (marqueur d'exposition au plomb).
- **Marqueurs de stress oxydatif** : malondialdéhyde (MDA, marqueur de peroxydation lipidique), 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG, marqueur d'oxydation de l'ADN), activité des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase).

7. Métabolisme des xénobiotiques

Le métabolisme des xénobiotiques (ou biotransformation) désigne l'ensemble des réactions enzymatiques par lesquelles l'organisme transforme une substance étrangère afin, le plus souvent, d'en faciliter l'élimination. Ce processus revêt une importance toxicologique majeure : il peut aboutir soit à une détoxification (formation de métabolites moins toxiques et plus facilement éliminables que la molécule mère), soit, à l'inverse, à une bioactivation (formation de métabolites plus réactifs et potentiellement plus toxiques que la molécule initiale).

7.1. Phase I : fonctionnalisation

La phase I regroupe notamment des réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse qui modifient la structure de la molécule. Les cytochromes P450, localisés en grande partie dans le réticulum endoplasmique hépatique, catalysent diverses oxydations grâce à l'oxygène et à des équivalents réducteurs fournis notamment par le NADPH.

Les isoformes du cytochrome sont CYP1A2, CYP2E1, CYP3A4/5 et CYP2D6. Leurs profils de substrats et leur variabilité conditionnent la vitesse et parfois la nature des métabolites formés.

7.2. Phase II : conjugaison

Les réactions de conjugaison fixent des groupements endogènes, souvent hydrophiles, par glucuronidation, sulfatation ou conjugaison au glutathion. Le but général est de faciliter la prise en charge et souvent l'élimination des métabolites.

Le glutathion participe notamment à la neutralisation de métabolites électrophiles réactifs. Les phases I et II ne constituent pas une séquence obligatoirement linéaire pour toutes les substances.

7.3. Phase III : transport et élimination

Les transporteurs membranaires contribuent à expulser les xénobiotiques ou leurs métabolites hors des cellules vers la bile ou le sang, puis vers les voies d'élimination. Les exemples du support comprennent P-gp, MRP2 et MRP3.

8. Facteurs de variabilité du métabolisme des xénobiotiques

Le métabolisme des xénobiotiques varie selon des facteurs génétiques, physiologiques et environnementaux, influençant leur efficacité et leur toxicité.

Facteur	Explication	Exemple
Polymorphisme génétique	Variations génétiques modifiant l'activité des enzymes de biotransformation.	CYP2D6, CYP2C19, NAT2 : métaboliseurs lents ou rapides.
Induction enzymatique	Augmentation de l'activité enzymatique, pouvant accélérer le métabolisme.	Rifampicine (CYP3A4), tabac (CYP1A2).

Inhibition enzymatique	Diminution de l'activité enzymatique, pouvant entraîner une accumulation toxique.	Jus de pamplemousse (CYP3A4 intestinal).
Facteurs physiologiques	Âge, sexe, grossesse, nutrition et état de santé influençant le métabolisme.	Immaturité enzymatique du nouveau-né, maladies hépatiques.
Facteurs environnementaux	Expositions et habitudes de vie modifiant l'activité enzymatique.	Tabac, alcool, médicaments, alimentation.
Variabilité inter-espèces	Différences enzymatiques entre espèces influençant la biotransformation.	Métabolisme différent chez le rat et l'humain.

À retenir : Ces facteurs peuvent modifier la vitesse de biotransformation des xénobiotiques, augmenter ou diminuer leur toxicité et expliquer les différences de réponse entre individus.

Attention : une accélération du métabolisme ne signifie pas toujours une diminution de la toxicité, car certaines réactions produisent des métabolites plus toxiques que la substance initiale.