



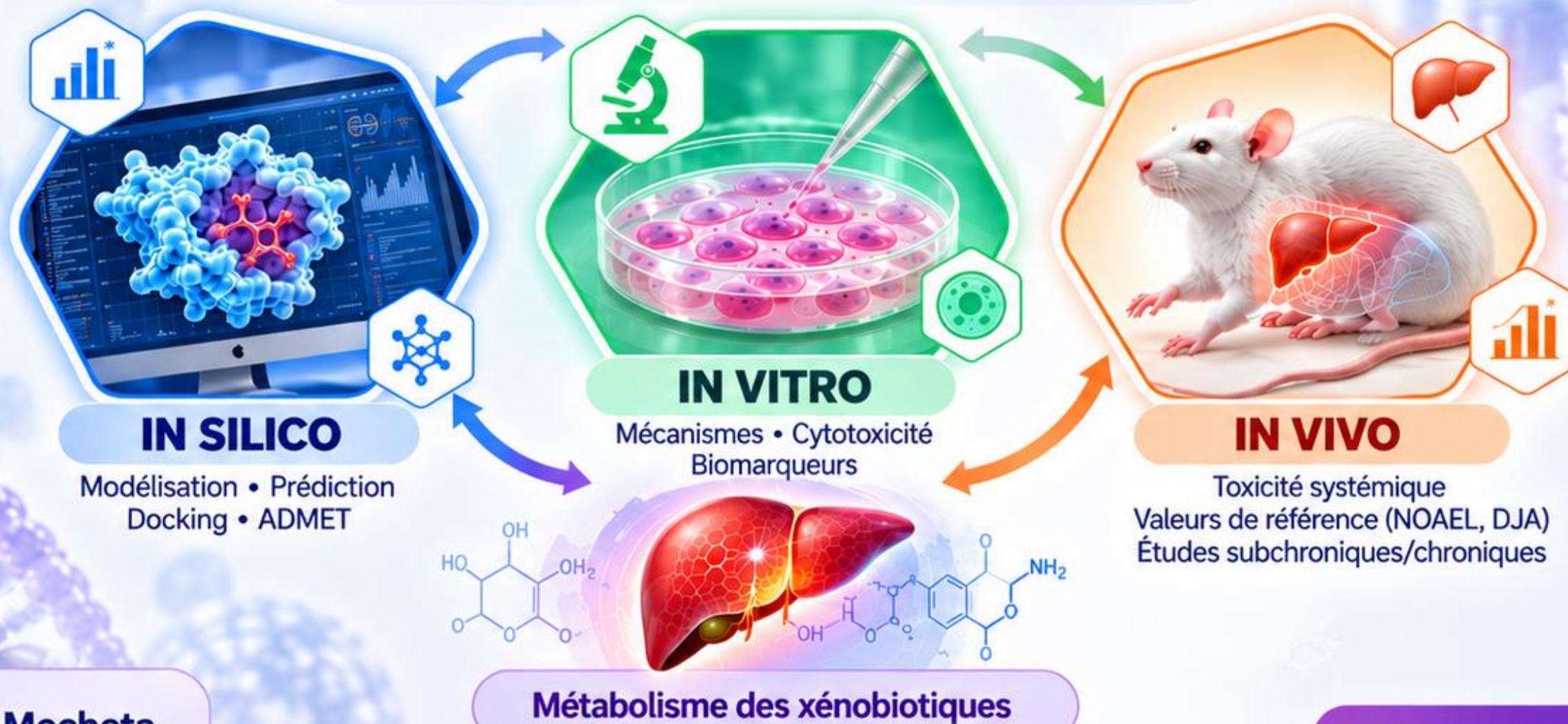
USTO-MB
Université des Sciences et de la Technologie
Mohamed Boudiaf - Oran



FSNV
USTO-MB
Faculté des Sciences
de la Nature et de la Vie
كلية علوم الطبيعة والحياة

2. Méthodes d'étude des xénobiotiques

- Approches in vivo, in vitro, in silico
- Suivi des biomarqueurs de toxicité
- Métabolisme des xénobiotiques



Dr. Asmaa Mecheta

Année universitaire 2026 - 2027

Qu'est-ce qu'un xénobiotique ?



Définition

Un xénobiotique est toute **substance étrangère à l'organisme**, qui n'est pas naturellement produite par le corps humain et qui peut y pénétrer par différentes voies d'exposition (orale, respiratoire, cutanée, parentérale).

Exemples de xénobiotiques



Médicaments

- Paracétamol
- Ibuprofène
- Antibiotiques
- Anticancéreux
- Antiépileptiques



Produits agricoles et phytosanitaires

- Pesticides (glyphosate, organophosphorés)
- Herbicides
- Fongicides
- Insecticides



Polluants environnementaux

- Métaux lourds (plomb, mercure, cadmium)
- Dioxines
- PCB (polychlorobiphényles)
- HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques)



Contaminants alimentaires

- Mycotoxines (aflatoxine B1)
- Additifs alimentaires (colorants, conservateurs)
- Résidus vétérinaires
- Contaminants de cuisson (acrylamide, HAP)



Produits de la vie courante et industrielle

- Cosmétiques (parabènes, filtres UV)
- Perturbateurs endocriniens (BPA, phtalates)
- Solvants industriels (benzène)
- Nanomatériaux
- Retardateurs de flamme

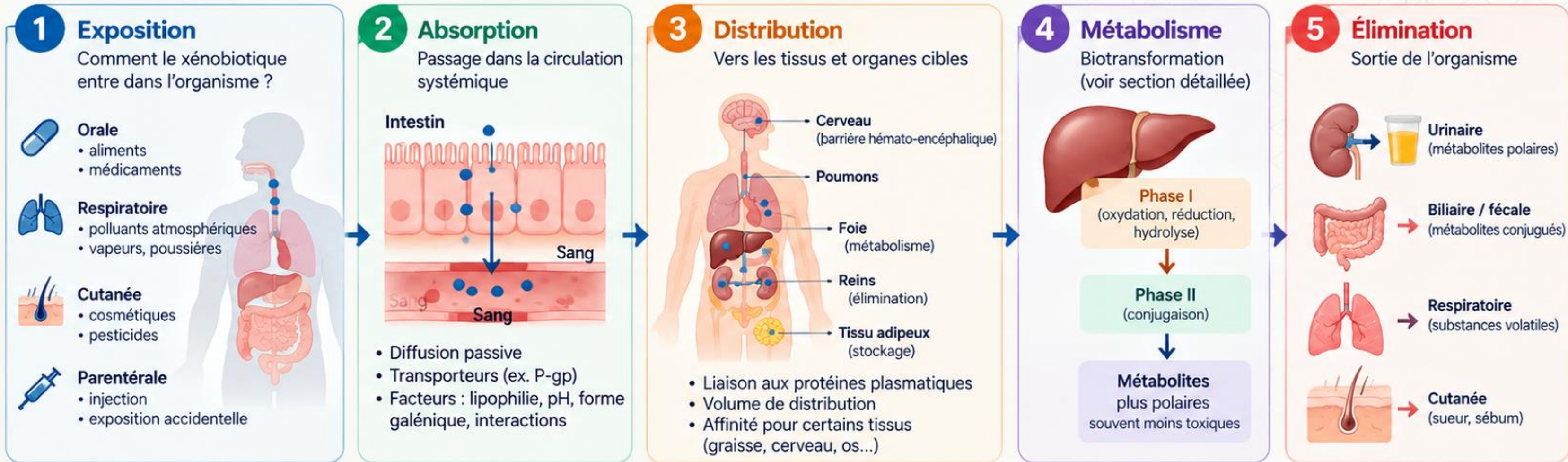


À retenir

Les xénobiotiques regroupent des molécules d'origines très diverses (médicamenteuses, agricoles, alimentaires, environnementales ou industrielles) et peuvent avoir des **effets bénéfiques, neutres ou toxiques** selon la dose, la durée et les conditions d'exposition.

Et ensuite ? Comprendre le devenir d'un xénobiotique dans l'organisme

De l'entrée dans l'organisme à l'effet biologique : les grandes étapes



Idée clé

Les effets toxicologiques d'un xénobiotique dépendent de son **absorption**, de sa **distribution**, de son **métabolisme** et de son **élimination**, qui déterminent sa concentration dans les organes cibles et la durée d'exposition.

Facteurs influençant le devenir d'un xénobiotique

- Génétiques**
 - Polymorphismes des enzymes et transporteurs
- Physiologiques**
 - Âge
 - Sexe
 - Grossesse
 - Fonction hépatique et rénale
- Interactions**
 - Inducteurs
 - Inhibiteurs
 - Associations médicamenteuses
 - Alimentation
- Environnementaux**
 - Dose
 - Durée
 - Voie d'exposition
 - Co-exposition à d'autres substances

Lien avec la toxicité

Le devenir métabolique peut conduire à des métabolites :

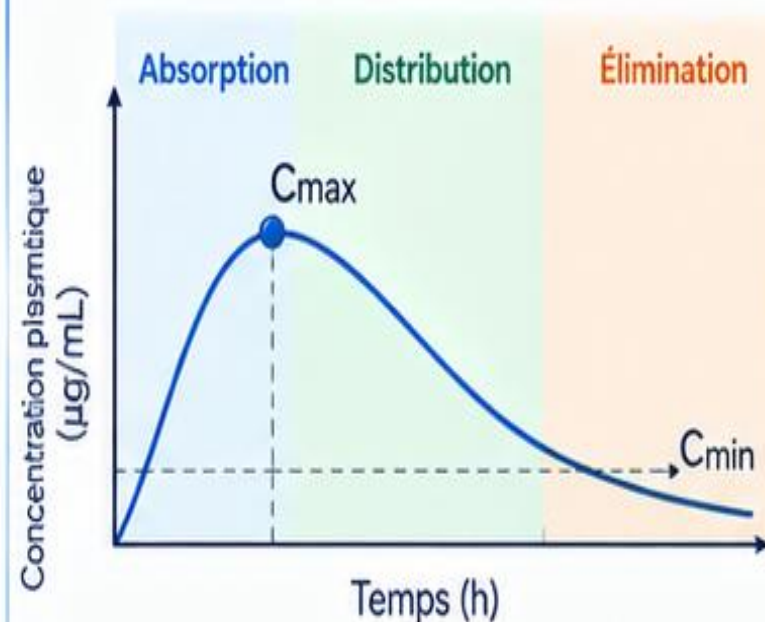
- Inactifs (détoxication)
- Plus polaires (facilement éliminés)
- Plus réactifs (bioactivation)
- Toxiques (lésions cellulaires, génotoxicité, cancérogénicité...)

Après l'ADME : de la concentration interne aux effets biologiques

Le devenir d'un xénobiotique dans l'organisme conditionne sa toxicité

6 Concentration interne

Un équilibre dynamique

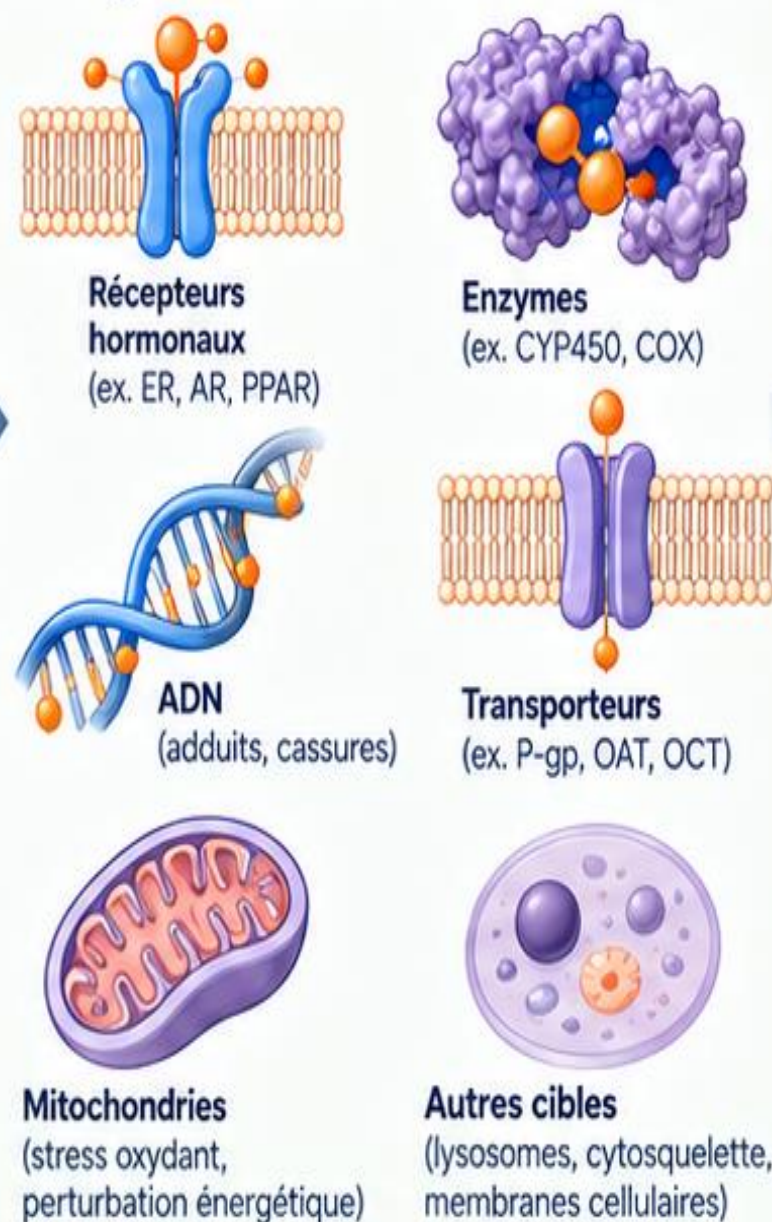


Paramètres toxicocinétiques clés

- C_{max} : concentration maximale
- T_{max} : temps pour atteindre C_{max}
- AUC : exposition globale
- t_{1/2} : demi-vie d'élimination

7 Interaction avec les cibles biologiques

Le xénobiotique ou ses métabolites peuvent interagir avec différentes cibles moléculaires.



8 Effets biologiques

Des effets moléculaires aux effets sur l'organisme

Effets moléculaires

- Inhibition/activation d'enzymes
- Stress oxydant
- Dommages à l'ADN
- Perturbation de la signalisation cellulaire

Effets cellulaires

- Cytotoxicité
- Apoptose / nécrose
- Altérations du cycle cellulaire
- Inflammation

Effets tissulaires et d'organes

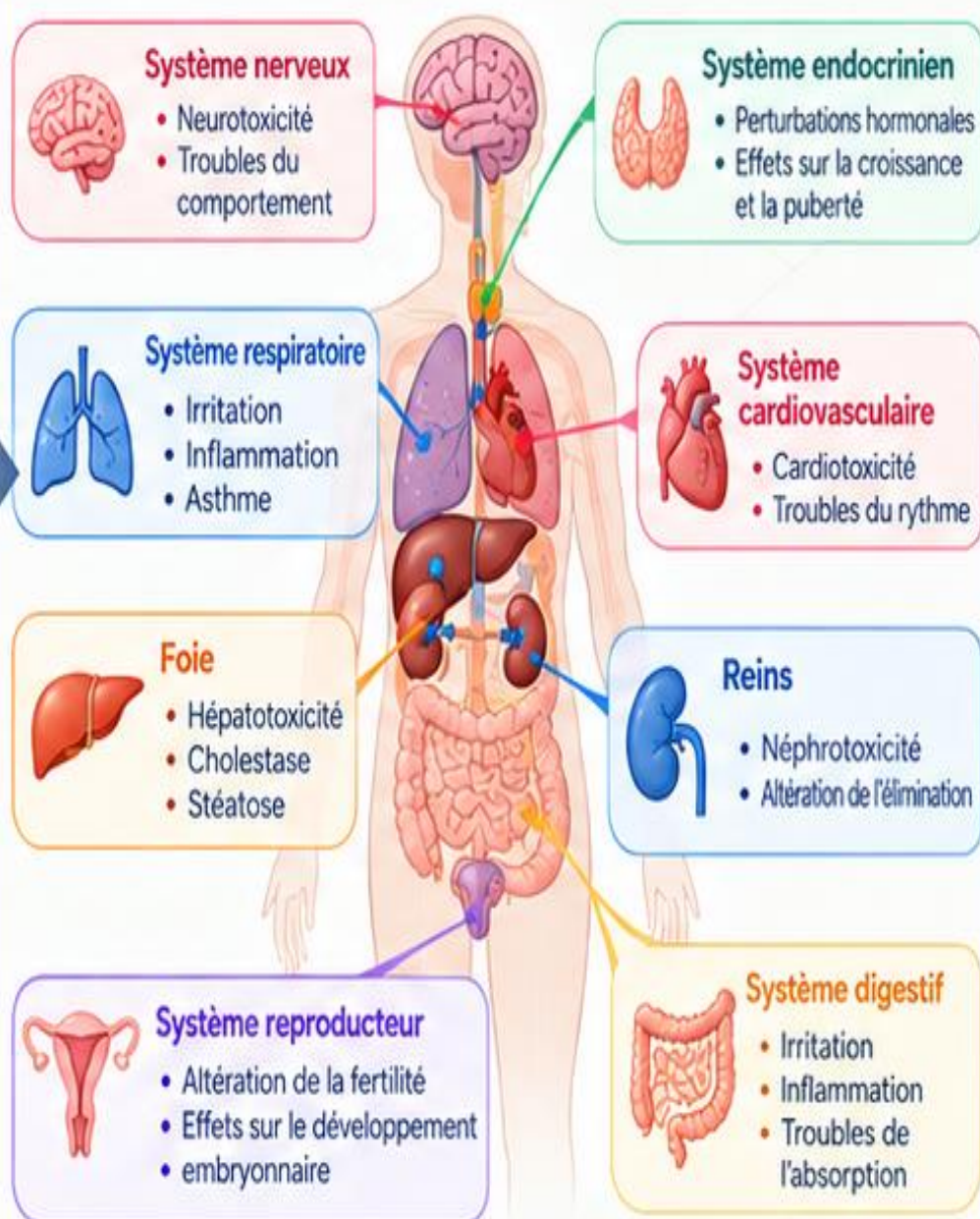
- Atteinte hépatique
- Atteinte rénale
- Atteinte neurologique
- Atteinte respiratoire
- Atteinte reproductive et développementale

Effets sur l'organisme

- Toxicité aiguë
- Toxicité subchronique et chronique
- Effets cancérogènes
- Effets reprotoxiques
- Effets perturbateurs endocriniens

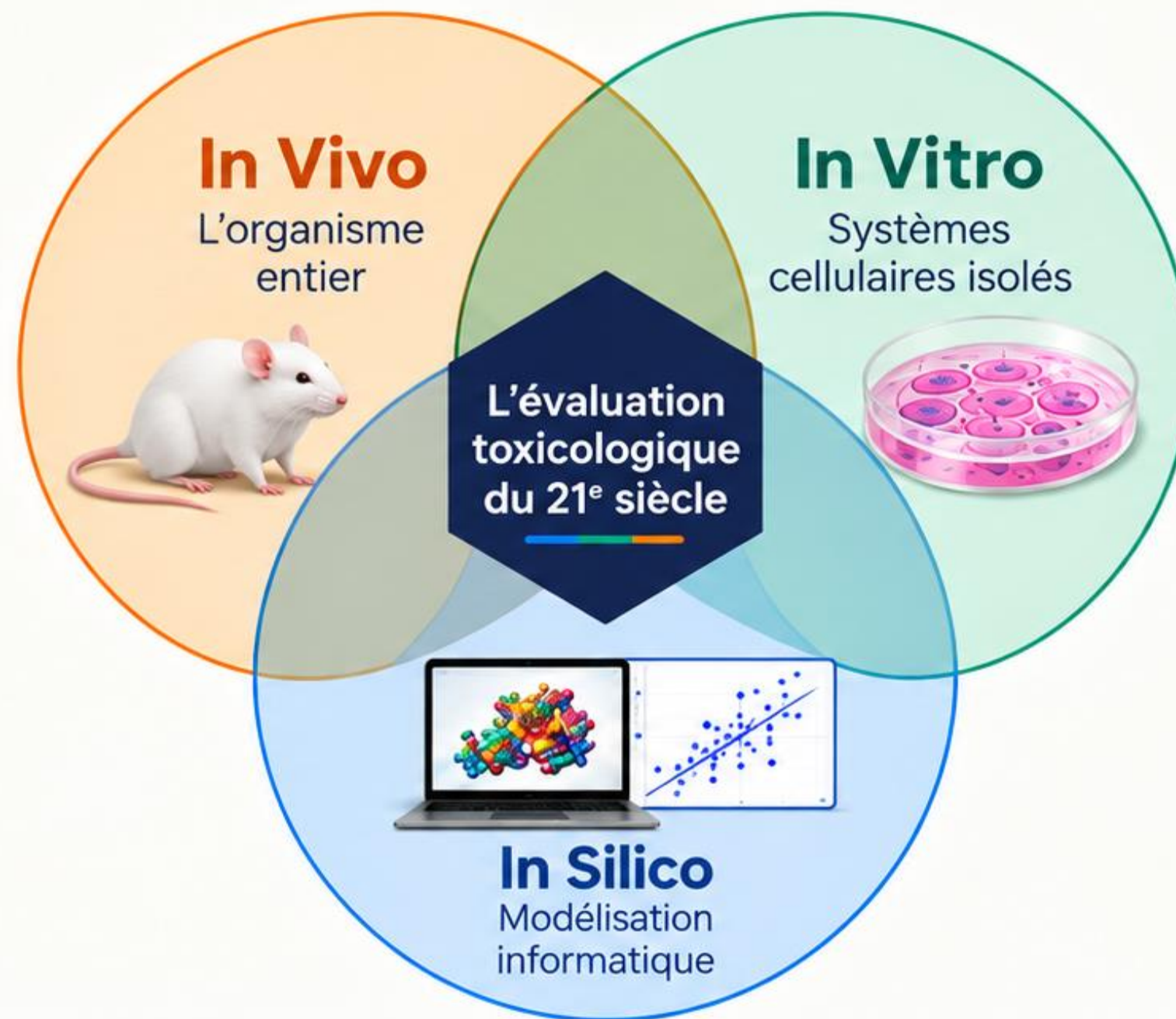
9 Exemples d'effets selon les organes cibles

Un même xénobiotique peut avoir plusieurs cibles.



L'évaluation toxicologique moderne

Une approche intégrée et complémentaire, non une substitution



À retenir

L'évaluation toxicologique moderne repose sur **l'intégration, non la substitution**.
Aucune méthode n'est intrinsèquement supérieure ; leur complémentarité permet une caractérisation plus fiable et plus complète du danger toxicologique.

Comment choisir la bonne méthode ?

Une approche intégrée et étape par étape

1 Définir l'objectif de l'étude



Dépistage initial (screening)
Comprendre un mécanisme
Évaluer un risque pour la santé humaine
Réglementation (REACH, OCDE...)
Étudier un effet à long terme
(cancérogénicité, reprotoxicité...)

2 Considérer le niveau d'information disponible



Données existantes
(structure chimique, données in silico, littérature)

Nouveau composé
(peu ou pas de données)

3 Prendre en compte les ressources



Coût
(in silico < in vitro < in vivo)



Temps
(rapide → in silico
modéré → in vitro
long → in vivo)



Considérations éthiques
(principe des 3R et réglementaires)

4 Choisir la méthode la plus adaptée (ou la combinaison)



In Silico

Dépistage rapide
Prédiction de la toxicité (QSAR, IA)
Identification des cibles/mécanismes
Priorisation des composés
Faible coût, pas d'animaux



À privilégier en première intention ou pour compléter les données.



In Vitro

Étude des mécanismes cellulaires et moléculaires
Toxicité spécifique d'un organe
Tests sur cellules humaines
Rapide, reproductible
Réduction de l'usage des animaux



À privilégier pour confirmer les effets et explorer les mécanismes.



In Vivo

Intégration de l'organisme entier
Étude des effets systémiques
Toxicocinétique complète (ADME)
Effets à long terme (reprotoxicité, cancérogénicité, neurotoxicité...)
Référence réglementaire



À privilégier lorsque l'effet in vivo est nécessaire ou exigé par la réglementation.

5 Stratégie intégrée



Dépistage
in silico



Confirmation
in vitro



Validation
in vivo

- ✓ Approche en cascade (screening → confirmation → validation)
- ✓ Choix selon l'objectif, le niveau de données, les ressources et les contraintes éthiques
- ✓ Utilisation complémentaire pour une évaluation plus fiable et plus complète
- ✓ Conformité aux lignes directrices internationales (OECD, REACH, etc.)

Quelle méthode pour quelles questions ?

Les approches sont complémentaires et répondent à des questions différentes.

1 Approche in vivo

L'organisme entier

Répond à

- Effets systémiques
- Toxicocinétique (ADME)
- Reproduction et développement
- Cancérogénicité
- Neurotoxicité
- Comportement

✓ Avantages

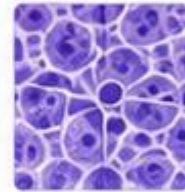
- Intégration physiologique
- Effets complexes
- Données réglementaires

— Limites

- Coût et durée
- Questions éthiques
- Variabilité inter-espèces
- Nombre d'animaux limité (3R)

2 Approche in vitro

Cellules, tissus, organoïdes



Lignée HepG2



Organoïde hépatique (3D)

Répond à

- Criblage rapide
- Mécanismes cellulaires et moléculaires
- Toxicité spécifique d'un organe
- Étude des voies de signalisation

✓ Avantages

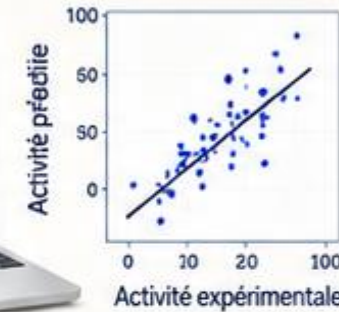
- Contrôle expérimental
- Rapidité et coût réduit
- Grands criblages
- Modèles humains disponibles

— Limites

- Pas d'intégration systémique
- Métabolisme limité
- Extrapolation à l'homme délicate

3 Approche in silico

Modèles informatiques



Répond à

- Prédiction de la toxicité (QSAR, IA)
- Prédiction de la toxicocinétique (PBPK)
- Identification des voies d'effet (AOP)
- Priorisation des substances
- Simulation de scénarios d'exposition

✓ Avantages

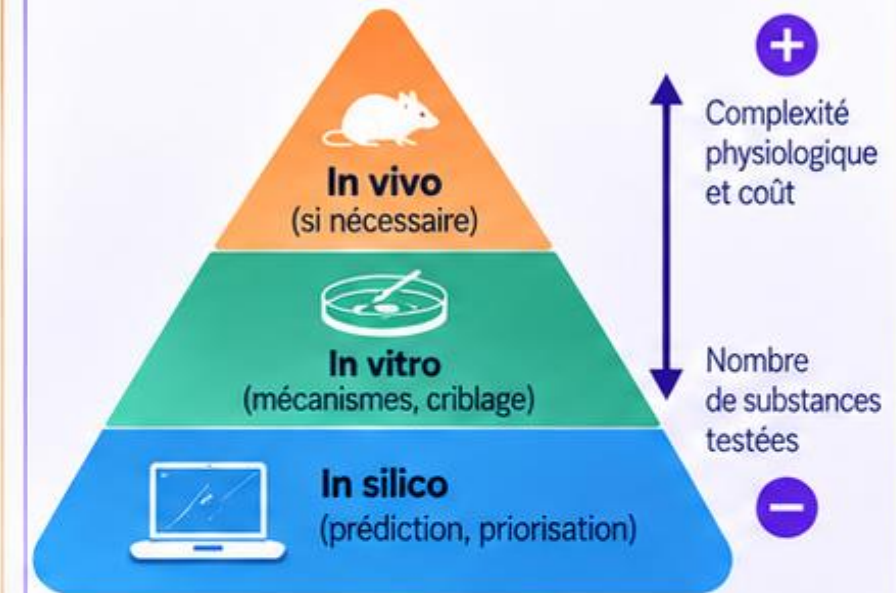
- Rapidité et faible coût
- Analyse de grands datasets
- Aide à la conception des essais

— Limites

- Qualité des données
- Incertitudes des modèles
- Nécessite validation expérimentale
- Pas adapté aux effets très complexes

4 Approches intégrées (IATA)

Combiner les forces de chaque méthode



🎯 Principe des 3R

- Remplacer (Replacement)
- Réduire (Reduction)
- Raffiner (Refinement)

⚙️ Objectif IATA

- Intégration des données
- Meilleure prédiction du risque
- Utilisation raisonnée des tests in vivo



À retenir

- Aucune méthode n'est **suffisante seule** : leur complémentarité permet une évaluation plus fiable du danger toxicologique.
- Le choix de la méthode dépend de la question posée, du stade d'évaluation et du contexte réglementaire.
- L'intégration des données (IATA) est la stratégie actuelle en toxicologie moderne.

Approche in vivo

L'organisme entier

1 Principe

Étudier les effets d'un xénobiotique sur un organisme entier, en conditions réelles d'exposition.



2 Modèles animaux



Rongeurs
Rat (le plus utilisé)
Souris



Poisson-zèbre
Développement
et effet à court terme



Lapin
Irritation cutanée
et oculaire

3 Voies et schémas d'exposition



Orale
(gavage)

Dose unique
ou répétée



Inhalation

Gaz, vapeurs,
aérosols, particules



Cutanée
(application)

Substance pure
ou formulation



Parentérale
(injection)

Intraveineuse,
intrapéritonéale,
sous-cutanée

4 Paramètres évalués

Effets cliniques



- Mortalité
- Signes cliniques
- Comportement
- Poids corporel
- Consommation d'eau/aliment

Effets sur organes



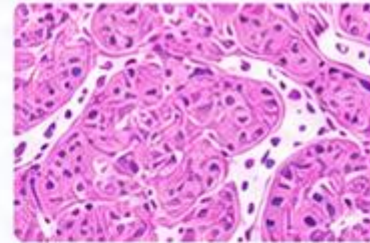
- Poids relatifs des organes
- Examen macroscopique
- Histopathologie

Paramètres biologiques



- Paramètres hématologiques (hémogramme)
- Paramètres biochimiques (foie, rein, métabolisme...)

Étude histopathologique



- Altérations tissulaires
- Inflammation
- Nécrose, apoptose
- Lésions spécifiques

5 Types d'études in vivo

Toxicité aiguë



Exposition unique
(24 h – 14 jours)
DL₅₀
et signes cliniques

Toxicité subchronique



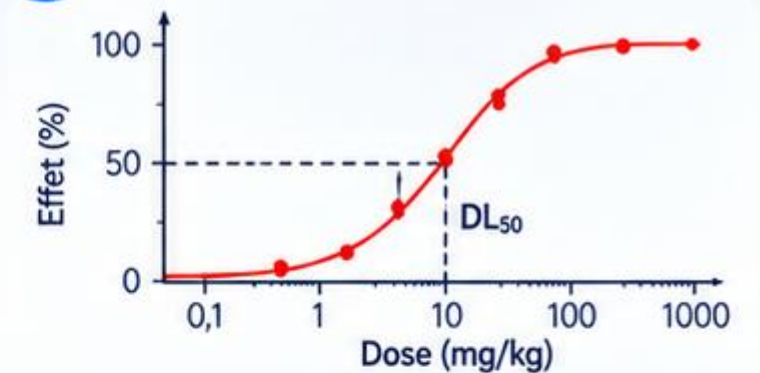
Exposition répétée
(28 – 90 jours)
Effets sur organes,
biomarqueurs

Toxicité chronique



Exposition répétée
(> 6 mois)
Effets à long terme :
reproduction, développement,
cancérogénicité, neurotoxicité...

6 Courbe dose-réponse



La courbe permet de déterminer la dose sans effet observable (NOAEL) et la dose minimale avec effet observable (LOAEL).

7 Avantages



- Intégration de tous les systèmes biologiques
- Réponse réaliste et complexe
- Permet d'évaluer la toxicité à long terme
- Indispensable pour l'évaluation du risque et la réglementation

8 Limites



- Coût élevé
- Durée longue
- Considérations éthiques et bien-être animal
- Variabilité inter-espèces
- Nombre d'animaux limité (3R)
- Extrapolation à l'homme parfois délicate

9 Application



- Évaluation du danger toxicologique
- Détermination des doses de référence (NOAEL, LOAEL, DL₅₀)
- Identification des organes cibles
- Étude des mécanismes d'action in vivo
- Appui pour la réglementation (médicaments, pesticides, cosmétiques, produits chimiques industriels)

Quel modèle animal choisir pour quelle analyse in vivo ?

Résumé des principales applications

	1 Rat (Rattus norvegicus) 	2 Souris (Mus musculus) 	3 Poisson-zèbre (Danio rerio) 	4 Lapin (Oryctolagus cuniculus) 
 Objectifs principaux	Toxicité systémique et effets chroniques	Mécanismes moléculaires et génétiques	Dépistage rapide du développement et de la toxicité	Irritation cutanée et oculaire Biocompatibilité
 Avantages	- Physiologie proche de l'humain - Grand nombre de données - Adapté aux études longues	- Modèles génétiques disponibles - Faible coût - Études mécanistiques	- Développement rapide - Transparent (observation directe) - Grand nombre de descendants - Faible coût	- Peau et yeux proches de l'humain - Modèle de référence en irritation/cosmétique
 Limites	Coût plus élevé Plus d'espace	Petits volumes sanguins Certaines différences avec l'humain	Moins adapté aux effets à long terme	Coût élevé Moins adapté aux études systémiques
 Durée d'étude	Longue (jours à 2 ans)	Courte à moyenne (jours à plusieurs mois)	Très courte (jours à semaines)	Courte à moyenne (jours à quelques mois)
 Coût	Élevé 	Faible à moyen 	Faible 	Élevé 
 Organes/ effets étudiés	 Foie, rein, cœur, cerveau Reproduction, cancérogenicité	 Immunité, métabolisme, développement, génétique	 Développement embryonnaire Cœur, neurotoxicité	 Peau, yeux Irritation, biocompatibilité
 Exemples d'analyses	 - Toxicité chronique (NOAEL) - Biochimie et histopathologie - Études de reproduction	 - Études mécanistiques - Expression génique (qPCR) - Modèles de maladies	 - Toxicité développementale - Tests comportementaux - Imagerie (fluorescence)	 - Tests d'irritation cutanée - Tests d'irritation oculaire - Études de biocompatibilité

Approche in vitro

Systèmes cellulaires isolés

1 Principe

Étudier les effets d'un xénobiotique sur des cellules, tissus ou organoïdes isolés en dehors de l'organisme, dans des conditions contrôlées.



2 Modèles in vitro

Cultures cellulaires 2D



- Lignées cellulaires (ex. HepG2, Caco-2, A549, SH-SY5Y)
- Cellules primaires

Organoïdes 3D



- Organoïdes hépatiques
- Organoïdes intestinaux
- Organoïdes cérébraux
- Reconstruction tissulaire

Co-cultures



- Hépatocytes + cellules immunitaires
- Épithélium + fibroblastes
- Modèles barrière (ex. BBB, intestinale)

3 Exemples d'essais et voies d'exposition

Exposition directe au milieu de culture



- Substance pure ou formulation
- Différentes concentrations

Co-exposition ou mélanges



- Mélanges de substances
- Interactions (chimiques, médicamenteuses)

Modèles de barrière



- Barrière intestinale
- Barrière hémato-encéphalique (BBB)
- Transport et perméabilité

Simulations métaboliques



- Systèmes S9 (métabolisme hépatique)
- Co-cultures avec microsomes
- Étude des métabolites

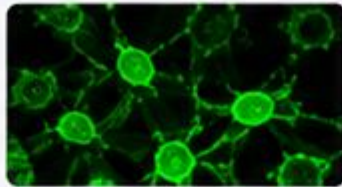
4 Paramètres évalués

Cytotoxicité



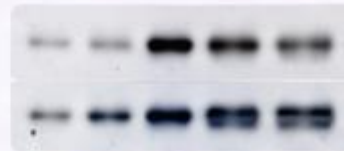
- Viabilité cellulaire (MTT, resazurine)
- LDH, ATP
- Morphologie cellulaire

Stress oxydant



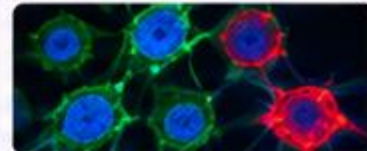
- ROS
- Antioxydants (GSH, SOD, CAT)
- Marqueurs d'oxydation

Mécanismes cellulaires



- Expression génique (qPCR)
- Protéines (Western blot)
- Voies de signalisation (NF- κ B, MAPK, ...)

Autres paramètres



- Apoptose / nécrose
- Cycle cellulaire
- Inflammation (cytokines : IL-6, TNF- α)
- Génotoxicité (comète, micronoyaux)

5 Types d'études in vitro

Toxicité aiguë



Exposition courte (24 h – 72 h)
CC₅₀ / IC₅₀ et effets précoces

Toxicité subchronique



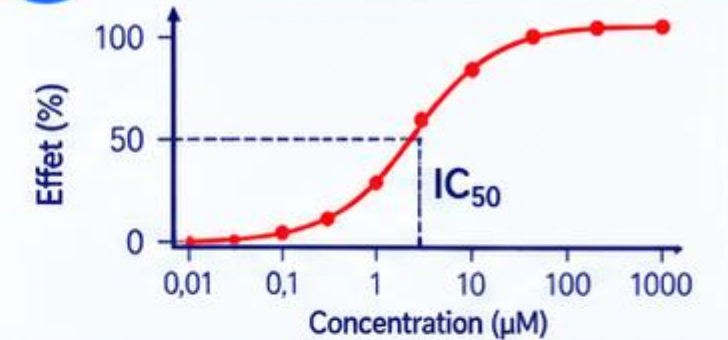
Exposition répétée (jours – semaines)
Effets sur mécanismes cellulaires et fonctionnels

Toxicité chronique



Exposition prolongée (semaines – mois)
Altérations cellulaires et moléculaires

6 Courbe dose-réponse



7 Avantages



- Contrôle expérimental et conditions standardisées
- Rapidité et coût réduit
- Utilisation de tissus humains
- Étude des mécanismes cellulaires
- Criblage de nombreuses substances
- Réduction du nombre d'animaux (3R)

8 Limites



- Pas d'intégration des effets systémiques
- Absence de métabolisme complet (sauf systèmes S9/co-cultures)
- Modèles parfois simplifiés
- Variabilité entre lignées cellulaires
- Extrapolation à l'organisme entier limitée
- Nécessité de validation par d'autres approches (in vivo, in silico)

9 Application



- Criblage et priorisation de substances
- Identification de cibles et de mécanismes d'action
- Évaluation de la toxicité spécifique d'un organe/tissu
- Étude des interactions et des mélanges
- Soutien à la réglementation (cosmétiques, pesticides, produits chimiques industriels)

In vitro : Comment choisir la bonne ligne cellulaire ?

Le choix dépend de l'objectif de l'étude et du tissu/effet à évaluer

	Peau (cutanée) Kératinocytes / Fibroblastes	Os Ostéoblastes	Cartilage Chondrocytes	Endothélium vasculaire HUVEC	Système immunitaire Macrophages (RAW 264.7)	Cancer Lignes tumorales (ex: HeLa, MCF-7, A549)	Intestin Caco-2	Foie HepG2	Neuronal Neurones (SH-SY5Y, PC12)
									
 Objectif principal	Cytotoxicité, cicatrisation, anti-inflammatoire	Ostéogénèse, biocompatibilité	Chondroprotection, arthrose	Toxicité vasculaire, angiogénèse	Réponse inflammatoire	Activité antitumorale	Absorption, perméabilité, toxicité digestive	Métabolisme, hépatotoxicité	Neurotoxicité, protection neuronale
 Exemples de lignées	HaCaT (NHDF)	MC3T3-E1 (hFOB)	ATDC5 (Primary chondrocytes)	HUVEC	RAW 264.7 (THP-1)	HeLa, MCF-7, A549, HT-29	Caco-2 (HT-29)	HepG2 (Huh7)	SH-SY5Y (PC12)
 Avantages	- Modèle humain - Bien caractérisé - Nombreux tests	- Modèle standard - Études mécanistiques	- Spécifique du tissu - Études dégénératives	Modèle pertinent pour la toxicité vasculaire	Réponse inflammatoire reproductible	- Tests rapides - Grand choix de lignées	- Modèle de barrière - Études d'absorption et perméabilité	- Métabolisme des xénobiotiques - Tests de toxicité	- Modèles pertinents - Études de neuroprotection
 Limites	- Modèle simplifié - Pas de système immunitaire	Différences avec l'humain	Culture parfois délicate	Variabilité du donneur	Lignées immortalisées (réponse partielle)	Ne représente pas les tissus sains	Temps de culture long (différenciation)	Métabolisme plus limité que l'in vivo	- Modèle simplifié - Ne remplace pas le cerveau entier



Étapes pour choisir la bonne cellule

1



Définir l'objectif de l'étude
(toxicité, mécanisme...)

2



Choisir l'organe/ tissu cible

3



Sélectionner une lignée pertinente
(bien caractérisée)

4



Valider par des tests complémentaires
(si nécessaire)



À retenir

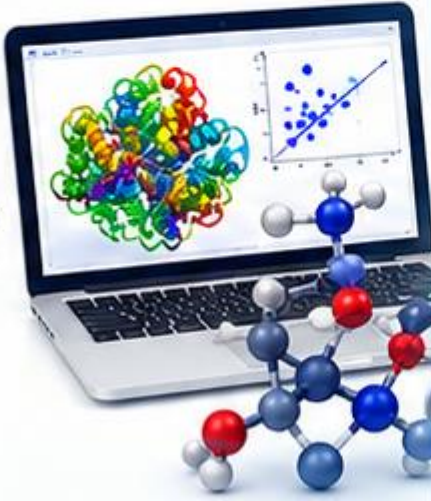
- Il n'existe pas une seule cellule idéale.
- Le choix dépend de l'objectif, du tissu cible et des paramètres étudiés.
- Utiliser des lignées bien caractérisées et adaptées à la question scientifique.
- Compléter si possible par plusieurs modèles cellulaires.

Approche in silico

Modélisation informatique

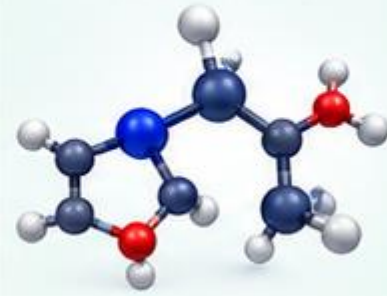
1 Principe

Utiliser des méthodes informatiques et des modèles mathématiques pour prédire la toxicité d'une substance, identifier ses cibles et comprendre ses mécanismes d'action, sans expérimentation sur l'animal.



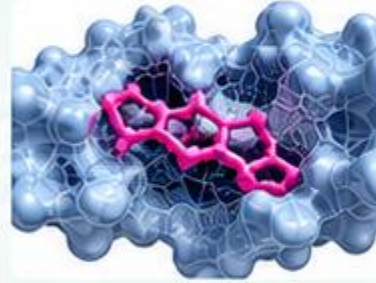
2 Approches et modèles

Modélisation de la structure



- Optimisation géométrique
- Propriétés physico-chimiques
- Descripteurs moléculaires (logP, poids moléculaire...)

Docking moléculaire



- Prédiction des cibles
- Affinité de liaison (énergie de liaison)
- Mode d'interaction (H-bonds, hydrophobes...)

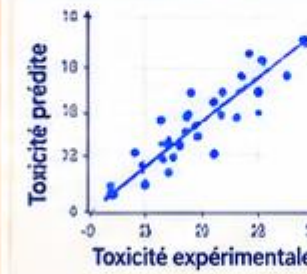
Simulations de dynamique moléculaire (MD)



- Stabilité du complexe
- Comportement en environnement aqueux
- Analyse de la flexibilité des protéines et des ligands

3 Exemples d'applications

Prédiction de toxicité (QSAR / IA)



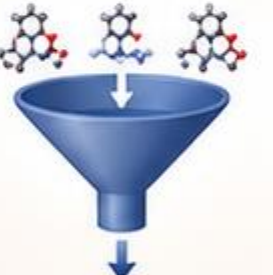
- Modèles QSAR
- Machine learning / IA
- Classification (toxique / non toxique)

Identification des cibles et des voies d'effet (AOP)



- Prédiction des protéines cibles
- Analyse des voies biologiques
- Construction de scénarios d'exposition

Criblage virtuel



- Screening de milliers de composés
- Priorisation des molécules
- Conception de composés plus sûrs (read-across)

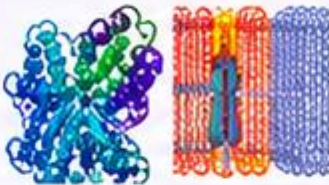
4 Paramètres évalués

Propriétés physico-chimiques



- logP, solubilité
- Poids moléculaire
- Polarité, charges
- Stabilité chimique

Toxicocinétique (ADME)



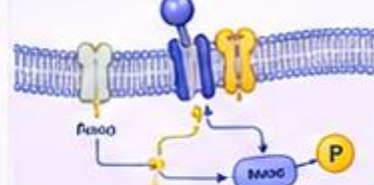
- Absorption (perméabilité)
- Distribution (liaison)
- Métabolisme (enzymes)
- Excrétion

Toxicité



- Génotoxicité
- Hépatotoxicité
- Neurotoxicité
- Cancérogénicité
- Perturbation endocrinienne

Mécanismes d'action



- Interaction ligand-cible
- Activation/inhibition de voies de signalisation
- Construction d'AOP

5 Types d'études in silico

Étude de criblage



Grand nombre de composés
Identification de hits
Priorisation

Étude mécanistique



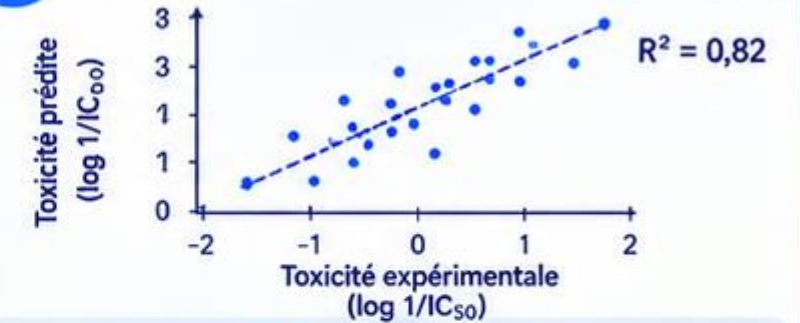
Interaction ligand-cible
Voies biologiques (AOP)
Analyse structurale

Étude de toxicocinétique



Prédiction ADME
Modèles PBPK
Estimation des concentrations dans les tissus

6 Exemple de prédiction (QSAR)



Les modèles QSAR permettent de prédire la toxicité à partir des descripteurs moléculaires et de prioriser les substances à tester *in vitro* ou *in vivo*.

7 Avantages



- Rapidité et faible coût
- Criblage de grands datasets
- Identification de cibles et de mécanismes d'action
- Réduction du nombre d'animaux (3R)
- Conception de composés plus sûrs
- Aide à la prise de décision réglementaire

8 Limites



- Dépendance à la qualité des données
- Incertitudes des modèles
- Ne remplace pas totalement les essais *in vitro*/*in vivo*
- Difficulté pour les mélanges et la métabolisation complexe
- Extrapolation à l'homme parfois limitée
- Nécessité de validation expérimentale

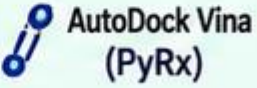
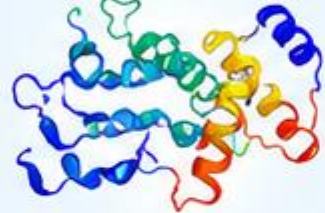
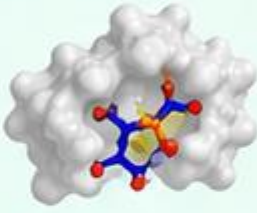
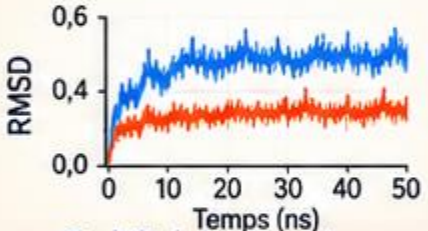
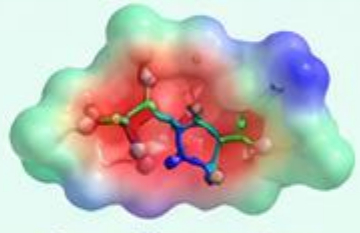
9 Application

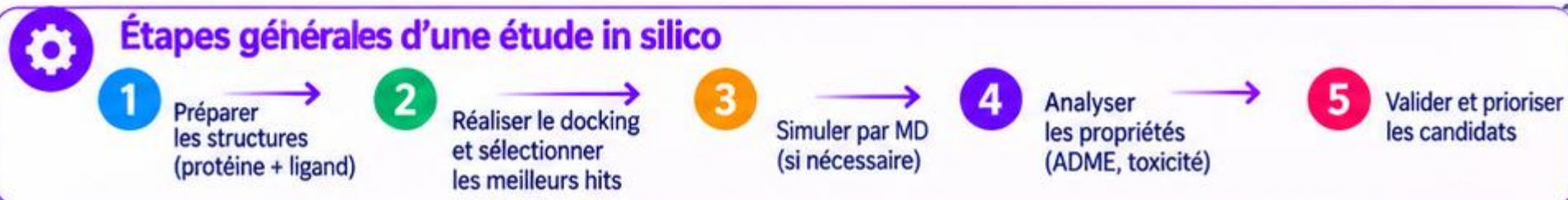


- Priorisation des substances à tester *in vitro*/*in vivo*
- Identification des organes cibles et des voies d'effet
- Évaluation préliminaire du risque toxicologique
- Optimisation de la conception de nouvelles molécules
- Soutien à la réglementation (REACH, OCDE...)
- Réduction de l'utilisation d'animaux (3R)

In silico : Comment choisir le bon outil ?

Selon votre objectif et le niveau de complexité de l'étude

	1. Récupérer et préparer les structures	2. Docking moléculaire	3. Dynamique moléculaire (MD)	4. Propriétés et ADME	5. Criblage virtuel (Virtual screening)	6. Approches avancées
 Objectif	Obtenir et préparer les structures de protéines et de ligands	Prédire l'interaction protéine-ligand et affinité	Évaluer la stabilité du complexe dans le temps	Prédire les propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques	Identifier plusieurs composés candidats	Études plus approfondies (si nécessaire)
 Type d'analyse	Recherche de séquences, homologie, préparation des structures 3D	Position et énergie, de liaison du ligand	Mouvement, stabilité, flexibilité, interactions	Absorption, distribution, métabolisme, excrétion, toxicité (ADME-T)	Docking à grande échelle (library screening)	Calculs d'énergie, mécanismes d'interaction, conception de nouveaux composés
 Outils courants (exemples)	   	   	   	   	   	 DFT (Gaussian, ORCA)  Pharmacophore (LigandScout)  FEP (Schrödinger)
 Avantages	- Rapide et accessible - Structures fiables	- Rapide - Bon pour le criblage	- Vision dynamique réaliste - Analyse détaillée des interactions	- Rapide et gratuit - Aide à la sélection des bons candidats	- Permet d'identifier rapidement plusieurs hits - Gain de temps et de coût	- Haute précision - Utile pour la conception de nouveaux composés
 Limites	- Qualité variable - Nécessite une validation	- Résultats statiques - Pas de dynamique	- Plus long et plus coûteux (ressources de calcul) - Paramétrage nécessaire	- Prédictions <i>in silico</i> - Doivent être confirmées expérimentalement	- Résultats à valider - Dépend de la qualité des librairies	- Très coûteux en temps/calculs - Épertise requise
 Exemple de résultat	 Structure 3D de la protéine (modélisée ou expérimentale)	 Position du ligand et score d'affinité	 Stabilité du complexe au cours du temps	 Profil ADME du composé	 Sélection des meilleurs candidats (hits)	 Carte d'interactions et énergie de liaison



 **À retenir**

- Il n'existe pas un seul outil : le choix dépend de l'objectif et du niveau de détail souhaité.
- Commencer par des outils simples (bases de données, docking), puis MD et approches avancées.
- Utiliser plusieurs outils et valider les résultats.
- Les études *in silico* complètent les analyses *in vitro* et *in vivo*.

Approche intégrée en toxicologie (IATA)

Combiner in silico, in vitro et in vivo pour une évaluation plus fiable, plus éthique et plus efficace

1 Qu'est-ce que l'IATA ?

Une stratégie qui combine de manière complémentaire plusieurs méthodes (in silico, in vitro, in vivo) et toutes les données disponibles (littérature, données réglementaires, humaines) pour évaluer le danger et le risque d'une substance de façon plus pertinente, fiable, rapide et éthique.



2 Pourquoi utiliser l'IATA ?



Tirer parti des forces complémentaires de chaque méthode



Répondre à des questions complexes avec une vision globale



Gagner du temps et réduire les coûts



Renforcer la robustesse scientifique des conclusions

3 Lien avec le principe des 3R

L'IATA permet de :



Remplacer (Replacement)

Utiliser in silico et in vitro pour le dépistage initial



Réduire (Reduction)

Limiter le nombre d'animaux aux études indispensables



Raffiner (Refinement)

Optimiser les protocoles pour minimiser la souffrance et améliorer le bien-être animal

4 Étapes d'une approche intégrée (IATA)

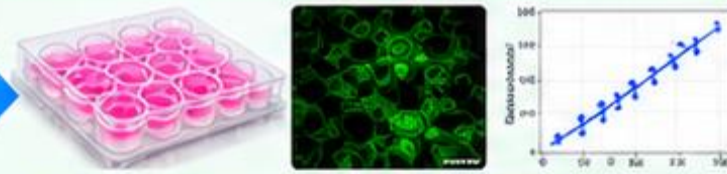
Étape 1 : Dépistage et priorisation (in silico)



- Criblage virtuel de nombreuses substances
- Prédiction de la toxicité (QSAR, IA)
- Identification des cibles et voies d'effet (AOP)
- Prédiction ADME/T (absorption, distribution, métabolisme, excrétion, toxicité)
- Sélection des composés prioritaires

Sortie : liste restreinte de substances à tester expérimentalement

Étape 2 : Études mécanistiques (in vitro)



- Évaluation de la cytotoxicité (MTT, ATP...)
- Étude des mécanismes cellulaires (stress oxydant, apoptose, inflammation...)
- Analyse des voies de signalisation (qPCR, Western blot)
- Tests sur modèles avancés (3D, co-cultures, organoïdes)
- Détermination de seuils de toxicité dans des cellules humaines pertinentes

Sortie : mécanismes d'action, doses critiques et marqueurs de toxicité

Étape 3 : Confirmation des effets (in vivo)



- Évaluation des effets systémiques (ADME, toxicité à long terme)
- Étude des organes cibles (histoire pathologique, biomarqueurs)
- Reprotoxicité, cancérogénicité si nécessaire
- Utilisation d'un nombre limité d'animaux, guidé par les résultats in silico et in vitro
- Protocoles optimisés (raffinement)

Sortie : confirmation du danger, relation dose-effet, effets sur l'organisme entier

Étape 4 : Intégration et décision (IATA)



- Toutes les données
- Intégration (approche poids de preuve)
- Décision
- Combinaison des résultats in silico, in vitro et in vivo
- Intégration des données existantes (humaines, environnementales, réglementaires, littérature)
- Analyse des incertitudes
- Détermination du danger et du risque
- Recommandations pour la réglementation et la gestion du risque

Sortie : conclusion scientifique robuste et recommandation réglementaire

5 Avantages de l'IATA



Évaluation plus complète et plus fiable



Priorisation efficace des substances



Réduction du temps et des coûts



Moins d'animaux utilisés (3R)



Meilleure compréhension des mécanismes d'action



Décisions réglementaires plus solides

6 Limites et défis



Intégration de données hétérogènes



Besoin d'expertise multidisciplinaire



Incertitudes des modèles et besoin de validation



Réglementation encore en évolution



Accès limité à certains modèles avancés



Complexité de l'analyse et de la prise de décision

7 Exemple d'application : une nouvelle substance

Criblage in silico



Prédiction de toxicité et ADME
Sélection des candidats

Tests in vitro



Confirmation des mécanismes
Détermination des doses

Validation in vivo



Évaluation des effets systémiques (organes cibles)

Décision IATA



Conclusion sur le danger et le risque
Recommandation réglementaire

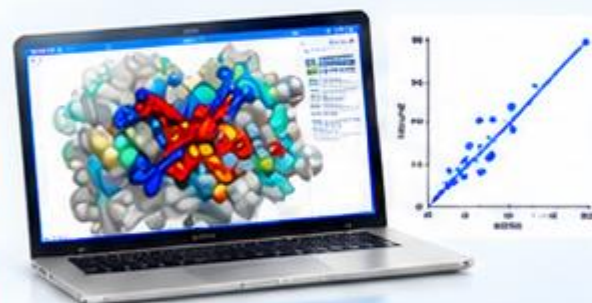
L'Éthique et le sommet de la pyramide : Le cadre in vivo (IATA)

Une approche intégrée pour une évaluation plus fiable, plus éthique et plus efficace

1

In silico (prédire)

Modélisation et priorisation



- QSAR, docking, MD
- Prédiction de la toxicité
- Identification des cibles et mécanismes d'action
- Priorisation des composés à tester

2

In vitro (mécanismes)

Études cellulaires et moléculaires



- Cytotoxicité (MTT, ATP, CE50)
- Stress oxydant (ROS, GSH...)
- Mécanismes cellulaires et voies de signalisation
- Étude dose-effet
- Sélection des doses à poursuivre in vivo

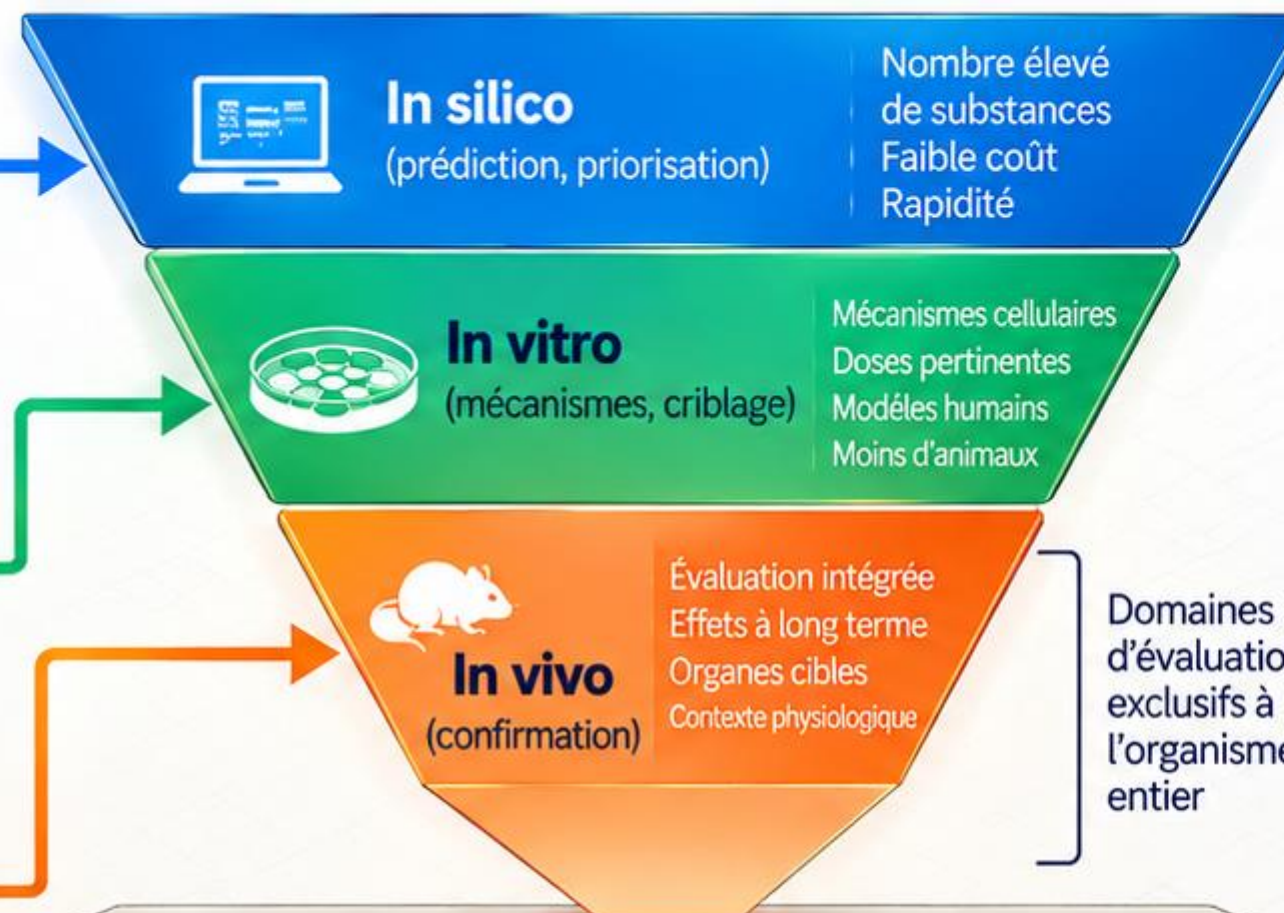
3

In vivo (confirmer)

Évaluation de l'organisme entier



- Effets systémiques
- Toxicocinétique (ADME)
- Reprotoxicité, cancérogénicité
- Neurotoxicité, immunotoxicité
- Confirmation des résultats



Le Principe des 3R (Russell & Burch, 1959)

REEMPLACER

Utiliser des méthodes alternatives si possible.



RÉDUIRE

Utiliser le minimum nécessaire d'animaux.



RAFFINER

Améliorer le bien-être et minimiser la douleur et la détresse.



Cadre réglementaire (OCDE)



Toxicité aiguë
(Dose fixe)



Doses répétées
(NOAEL, LOAEL)



Cancérogénicité
(2 ans, rongeurs)



Reprotoxicité et développement



Neurotoxicité



Immunotoxicité



Objectif de l'IATA

Intégrer les approches in silico, in vitro et in vivo pour une évaluation plus fiable, plus éthique et plus efficace.



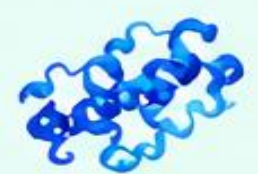
À retenir

- Le choix de la méthode dépend de la question scientifique et du contexte réglementaire.
- Les approches sont complémentaires et non exclusives.
- L'IATA permet d'évaluer le danger et le risque de façon plus pertinente tout en respectant le principe des 3R.

Les biomarqueurs : définition

Un biomarqueur est une **molécule**, un **paramètre biologique** ou une **caractéristique mesurable** qui reflète un état biologique normal ou pathologique, ou une réponse à une exposition ou à un traitement.

Exemples de biomarqueurs



Protéines
ex : IL-6, TNF- α ,
CRP, caspase-3



Gènes / ARNm
ex : p53, BAX,
CYP450



Métabolites
ex : MDA,
GSH, ROS



Paramètres cellulaires
ex : viabilité, stress
oxydant, apoptose

Types de biomarqueurs



Diagnostic
Indique la présence d'une maladie
ex : PSA (cancer de la prostate)



Pronostique
Prédit l'évolution de la maladie
ex : survie, récurrence



Prédictif
Prévoit la réponse à un traitement
ex : HER2 (réponse au trastuzumab)



Pharmacodynamique
Indique l'effet d'un traitement
ex : diminution de IL-6 après traitement



D'exposition (ou de toxicité)
Indique une exposition à un toxique
ex : métaux lourds, MDA, AChE

Où les mesurer ?



Sang
Protéines, métabolites,
cytokines, gènes



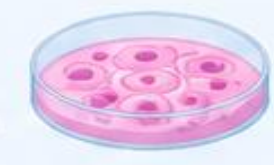
Urine
Métabolites,
marqueurs
d'exposition



Tissus
Expression génique,
protéines, histologie



Cellules
Viabilité, stress
oxydant, apoptose



**Milieu de culture
(in vitro)**
Cytokines, enzymes,
métabolites

Rôle des biomarqueurs



Détection précoce
Identifier un effet ou une maladie
avant les symptômes



Compréhension des mécanismes
Suivre les voies biologiques impliquées



Évaluation de l'efficacité
Mesurer la réponse à un traitement
ou une intervention



Évaluation du risque / toxicité
Détecter des effets indésirables



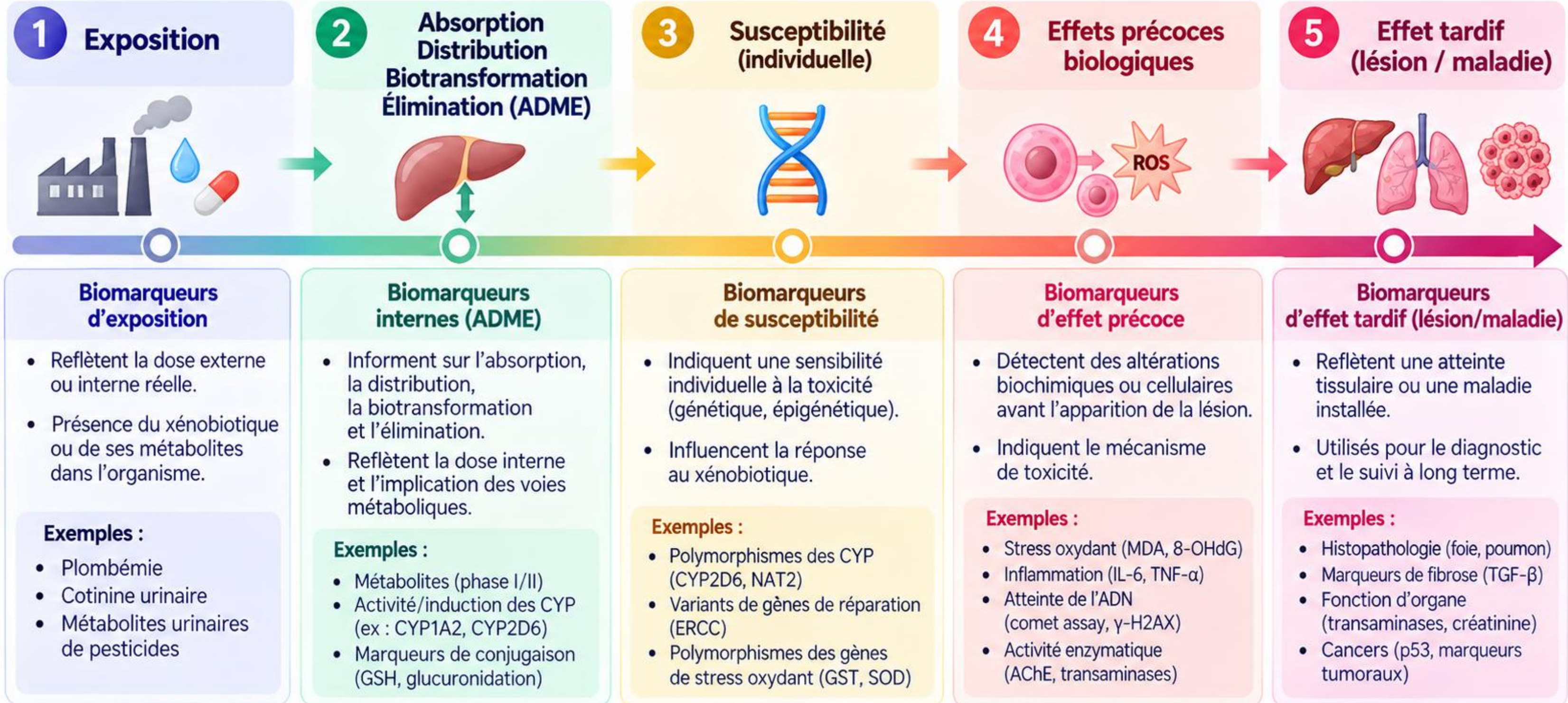
Aide à la décision
Choisir la meilleure stratégie
thérapeutique



À retenir

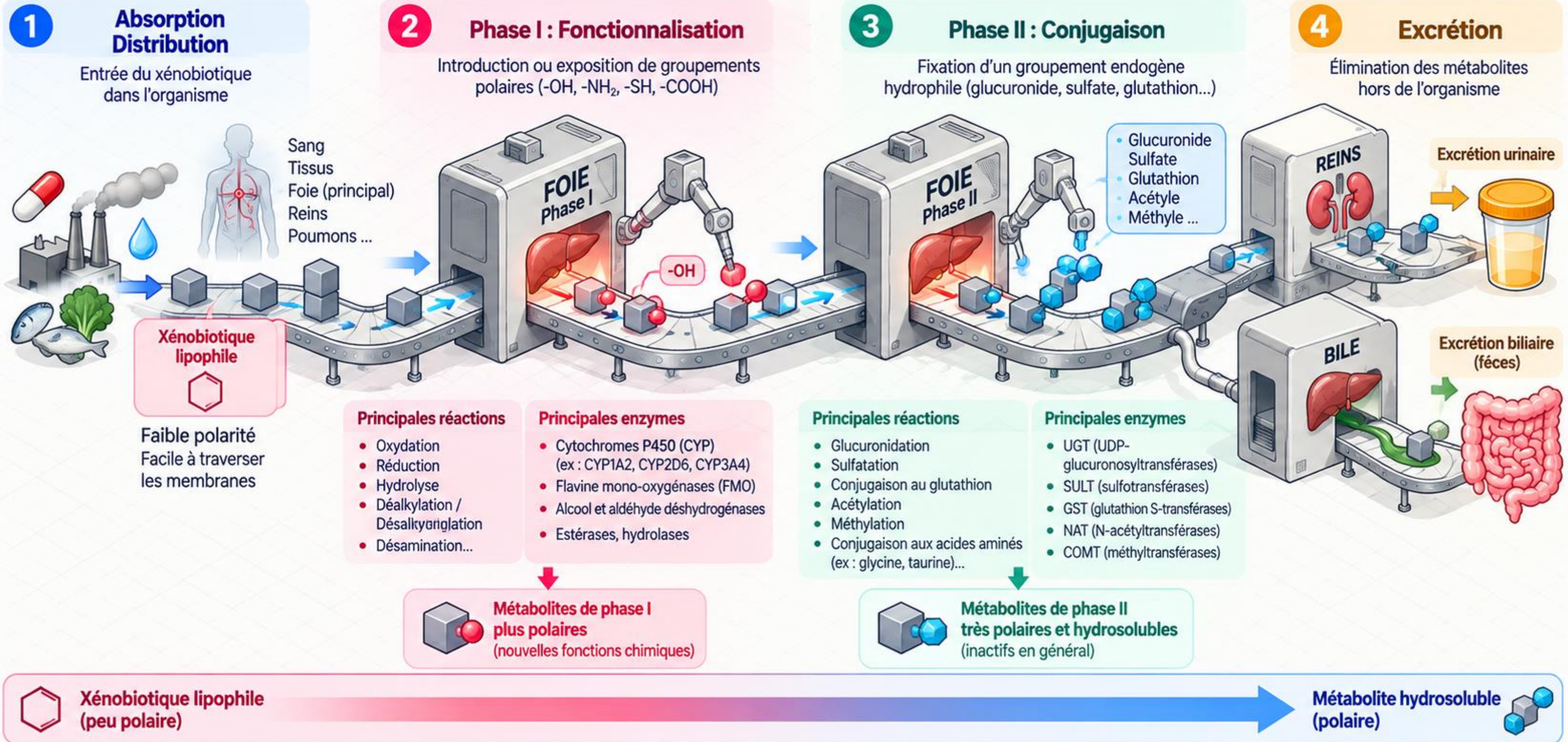
- Un biomarqueur est un indicateur mesurable d'un état biologique.
- Il peut être une **protéine**, un **gène**, un **métabolite** ou un **paramètre cellulaire**.
- Il est utilisé pour le diagnostic, le pronostic, la prédiction, le suivi d'un traitement ou l'évaluation de la toxicité.

Le continuum toxicologique: tracer le xénobiotique de l'environnement à la lésion



Métabolisme des xénobiotiques

De molécules lipophiles à des métabolites plus polaires pour faciliter l'élimination



1 Phase I : Fonctionnalisation par les cytochromes P450 (CYP)

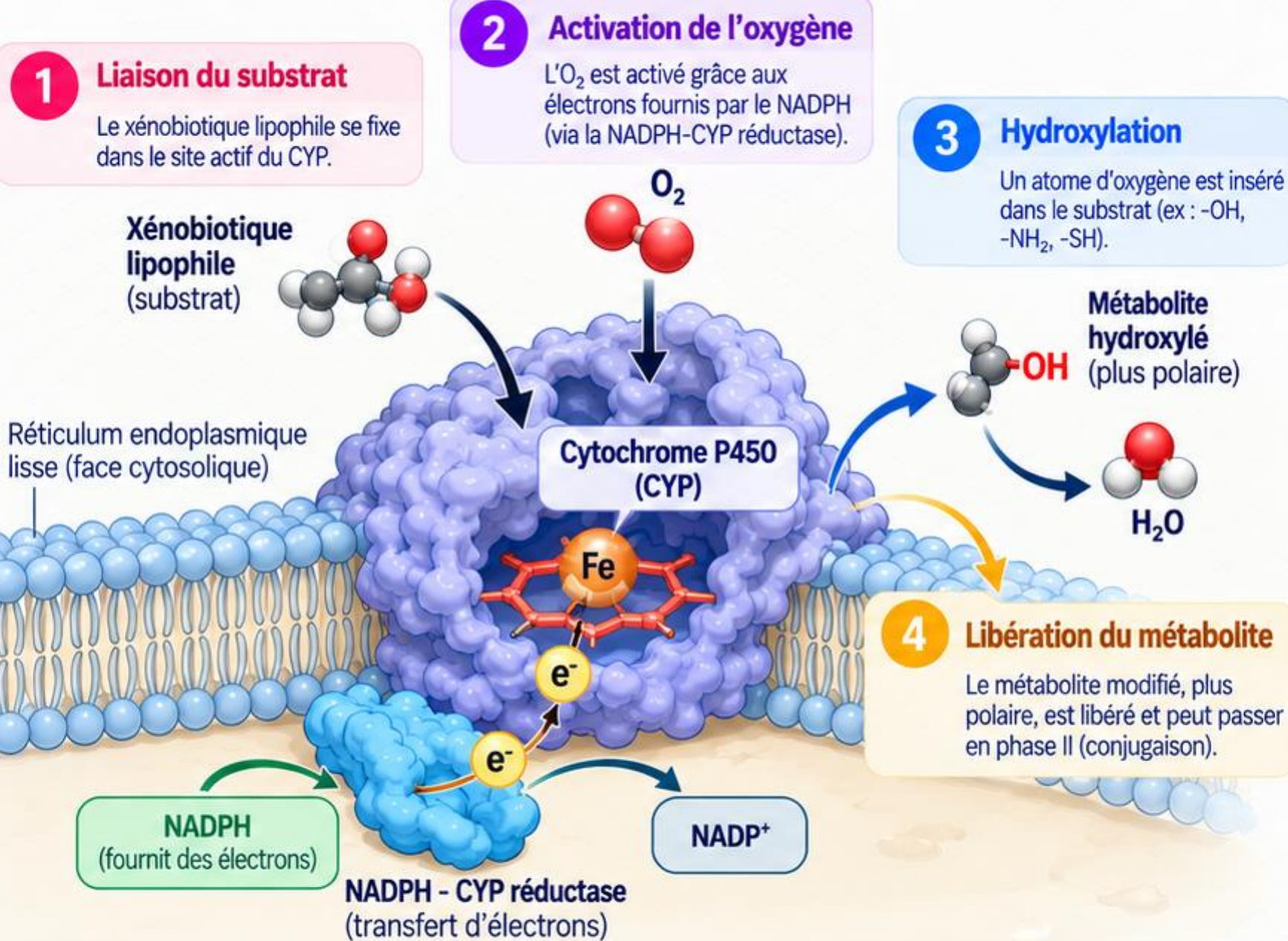
Introduction de groupes polaires pour augmenter la réactivité et permettre la phase II

Objectif

- Introduire ou exposer des groupes fonctionnels polaires (-OH, -NH₂, -SH, -COOH).
- Augmenter la réactivité du xénobiotique pour faciliter la conjugaison (phase II).
- Réactions principalement d'oxydation, mais aussi réduction, hydrolyse, déalkylation, désamination, époxydation.

Lieu et acteurs

- Cytochromes P450 (CYP) localisés dans la membrane du réticulum endoplasmique lisse (foie, intestin, poumons...).
- Co-facteurs : NADPH (via la NADPH-CYP réductase).
- Hémoprotéines à noyau hème (contenant du fer).



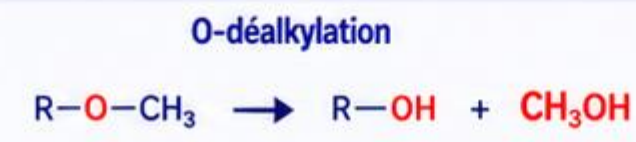
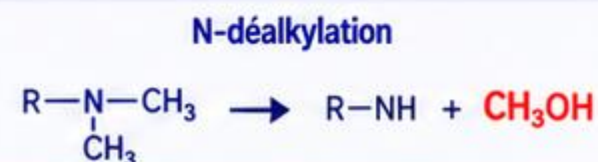
Principales réactions de phase I (CYP)

- Oxydation (hydroxylation)
- Réduction
- Hydrolyse
- Déalkylation / Désalkylation
- Désamination
- Époxydation ...

Quelques isoformes clés

Isoforme	Caractéristiques / Substrats
CYP3A4/5	La plus abondante (~50% des médicaments). Substrats : statines, immunosuppresseurs...
CYP2D6	Fort polymorphisme génétique. Substrats : codéine, antidépresseurs, β-bloquants...
CYP2C9 / 2C19	Substrats : warfarine (2C9), antiépileptiques (2C19), IPP, clopidogrel (2C19) ...
CYP1A2	Inductible par le tabac (HAP). Substrats : caféine, amines aromatiques...
CYP2E1	Métabolisme de l'éthanol et des solvants. Substrats : éthanol, paracétamol (toxicité) ...

Exemples de réactions d'oxydation (hydroxylation)



Les principales isoformes des cytochromes P450 (CYP)

Des spécificités de substrats et d'implications toxicologiques

CYP1A2 – L'Inductible



Induction

Fumée de tabac, hydrocarbures aromatiques (HAP)



Substrats principaux

Caféine, amines aromatiques, certains médicaments



Rôle / Particularité

Activité augmentée par le tabac (induction).



CYP2E1 – Le Toxiqueur



Substrats principaux

Éthanol, solvants (acétone, benzène), paracétamol.



Rôle / Particularité

Produit des métabolites réactifs (ex : NAPQI pour le paracétamol). Impliqué dans la toxicité.



CYP3A4/5 – Le Géant



Importance

Métabolise ~50% des médicaments cliniques.



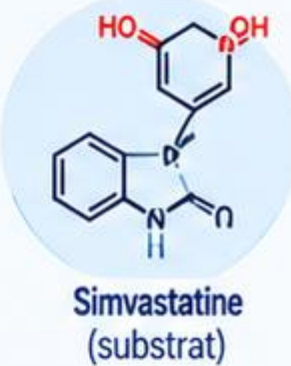
Substrats principaux

Statines, immunosuppresseurs, benzodiazépines, antiarythmiques...



Rôle / Particularité

Large spécificité de substrats, forte présence hépatique et intestinale.



CYP2D6 – Le Polymorphe



Variabilité génétique

Grand polymorphisme (inter-individuel).



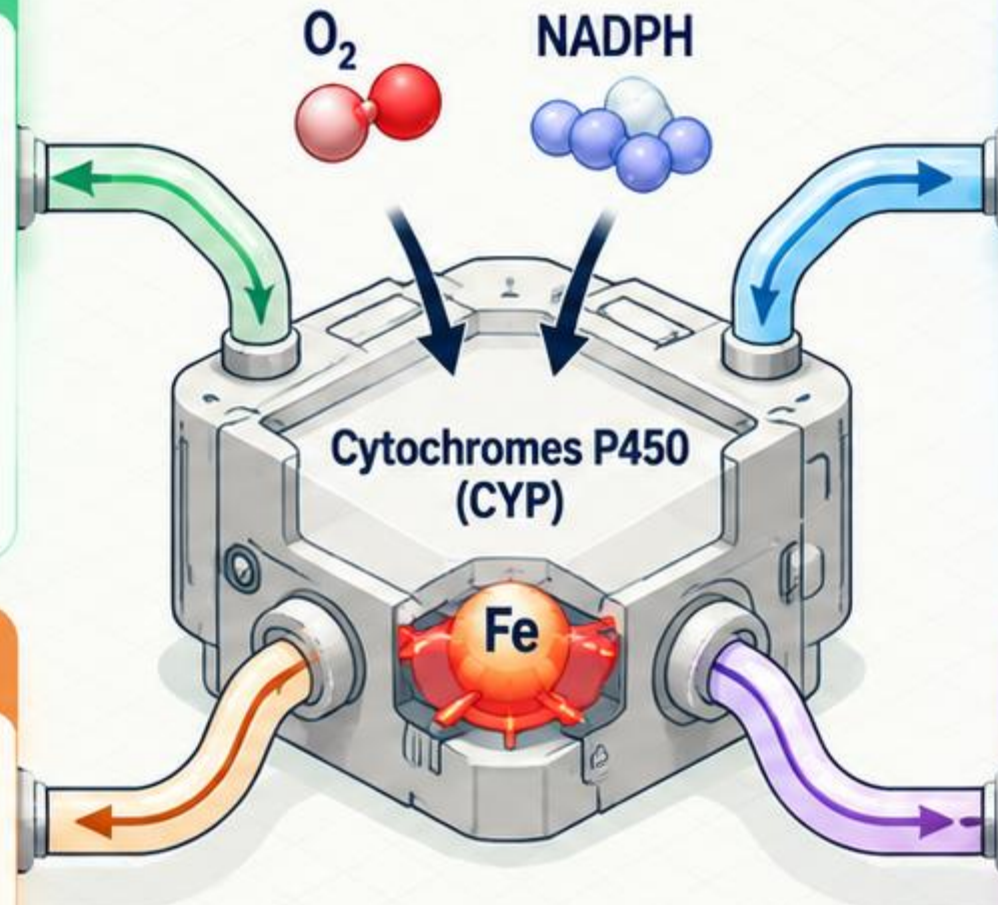
Substrats principaux

Codéine, antidépresseurs, β-bloquants, antipsychotiques...



Rôle / Particularité

Réponse variable selon le profil génétique (métaboliseurs lents/rapides).



Autres isoformes (exemples)



CYP2C9 / 2C19

- Warfarine (CYP2C9)
- Antiépileptiques (CYP2C9, 2C19)
- IPP (CYP2C19)



CYP2B6

- Antirétroviraux (efavirenz)
- Certains anticancéreux



CYP2A6

- Nicotine (métabolisme)
- Certaines nitrosamines

2 Phase II : Conjugaison des métabolites

Fixation de groupements endogènes hydrophiles pour augmenter la polarité et faciliter l'élimination

Objectif

- Conjuguer le xénobiotique ou son métabolite de phase I avec un groupement endogène hydrophile.
- Augmenter fortement la polarité.
- Favoriser l'élimination urinaire ou biliaire.

Caractéristiques

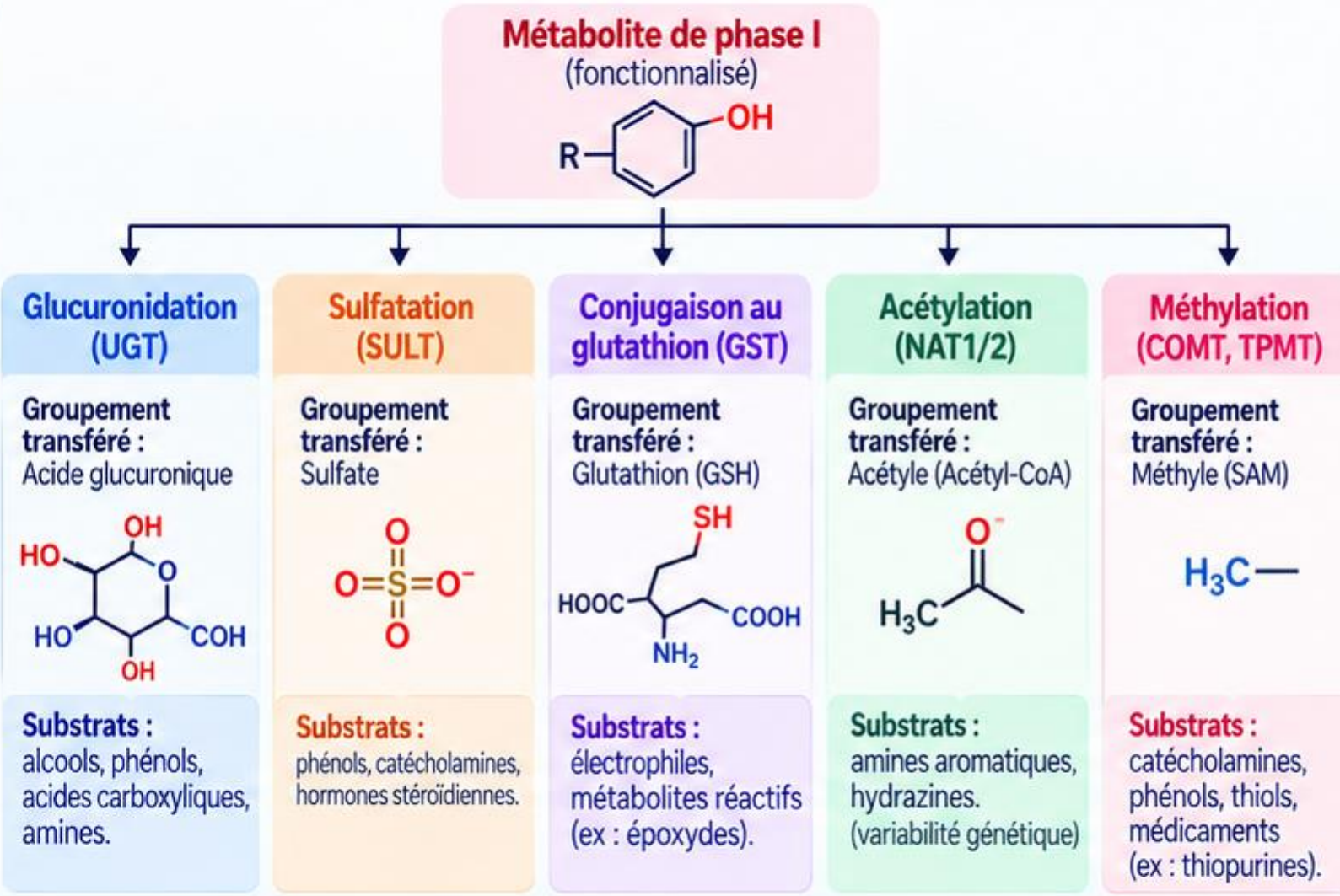
- Concerne des métabolites fonctionnalisés (ex : -OH, -NH₂, -SH, -COOH) issus de la phase I.
- Réactions principalement cytosoliques (certaines dans le RE).
- Enzymes spécifiques à haute capacité.
- Aboutit généralement à des métabolites plus polaires et moins toxiques.

Lieu principal

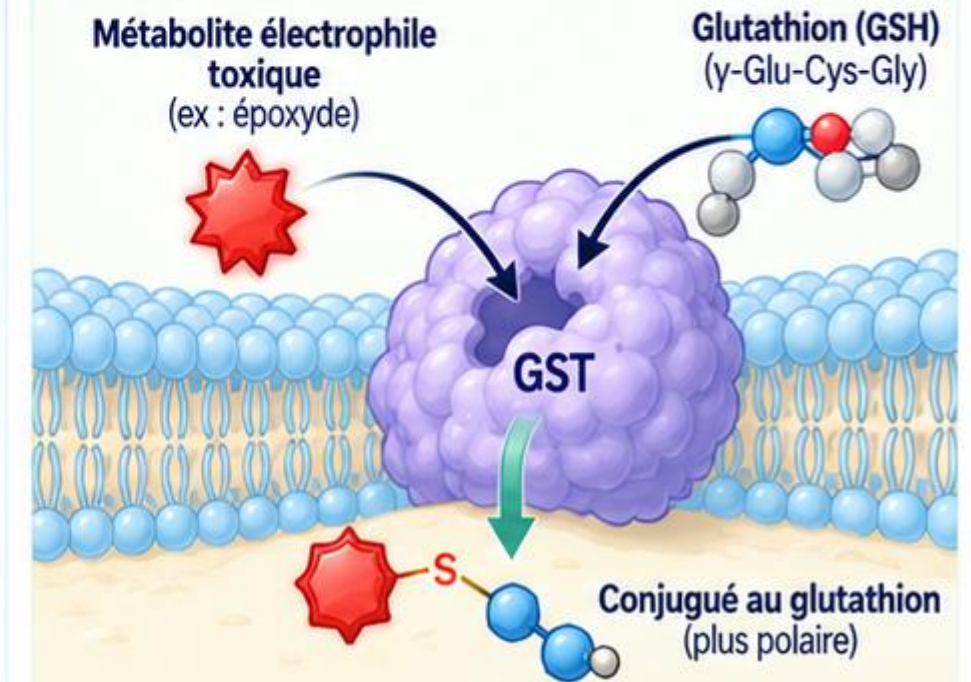


Cytosol des hépatocytes (principalement)
(certaines enzymes dans le réticulum endoplasmique ou la mitochondrie).

Principales voies de conjugaison



Zoom : la conjugaison au glutathion (GST)

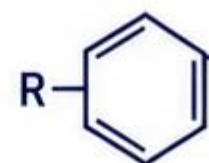


Rôle du glutathion

- Le GSH agit comme un bouclier sacrificiel.
- Il neutralise les métabolites réactifs avant qu'ils n'endommagent l'ADN ou les protéines hépatiques.
- Les conjugués peuvent être éliminés directement dans les urines ou être transformés en dérivés (acides mercapturiques).

Conséquences de la phase II

Métabolite conjugué



Conjugué

- Plus polaire (hydrosoluble)
- En général moins toxique
- Facilement éliminable



Excrétion urinaire
(métabolites hydrosolubles)



Excrétion biliaire
(métabolites conjugués de haut poids moléculaire)

3

Phase III : Transport et Élimination

Export des métabolites pour leur élimination dans l'urine ou la bile

Objectif

- Expulser le xénobiotique ou ses métabolites (plus polaires) hors des cellules.
- Assurer leur élimination par voie urinaire ou biliaire.

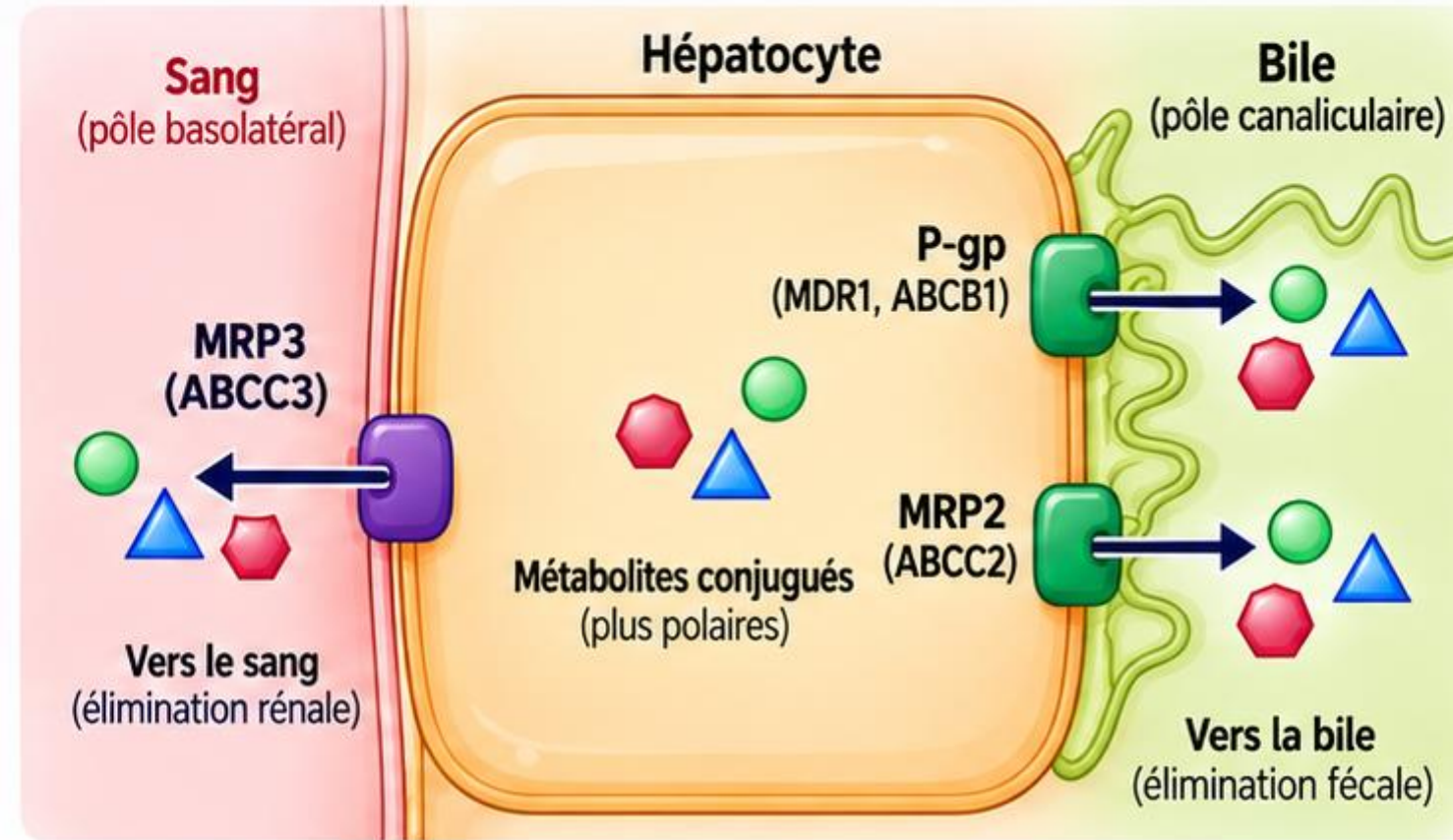
Caractéristiques

- Transport actif dépendant de l'ATP.
- Impliqué des transporteurs membranaires (famille ABC).
- Concerne principalement les métabolites de phase I et II (conjugués, plus polaires).

Lieu principal



Membrane des hépatocytes :
pôle canaliculaire (bile)
et pôle basolatéral (sang).



Principaux transporteurs (famille ABC)

Transporteur	Localisation	Substrats principaux	Rôle
P-gp (MDR1, ABCB1)	Pôle canaliculaire	Xénobiotiques, médicaments	Efflux vers la bile (lumière intestinale)
MRP2 (ABCC2)	Pôle canaliculaire	Métabolites conjugués (GSH, glucuronides, sulfates)	Efflux vers la bile
MRP3 (ABCC3)	Pôle basolatéral	Métabolites conjugués	Efflux vers le sang → élimination rénale
OATP (SLC)	Pôle sinusoidal (entrée)	Xénobiotiques, métabolites	Entrée dans l'hépatocyte depuis le sang

Voies d'élimination



Voie biliaire

- Via P-gp et MRP2.
- Métabolites conjugués (GSH, glucuronides, sulfates).
- Élimination dans la bile → intestin → fèces.



Bile
→ Intestin
→ Fèces



Voie rénale

- Via MRP3 (et autres transporteurs rénaux).
- Métabolites hydrosolubles.
- Filtration et sécrétion tubulaire → urine.



Urine



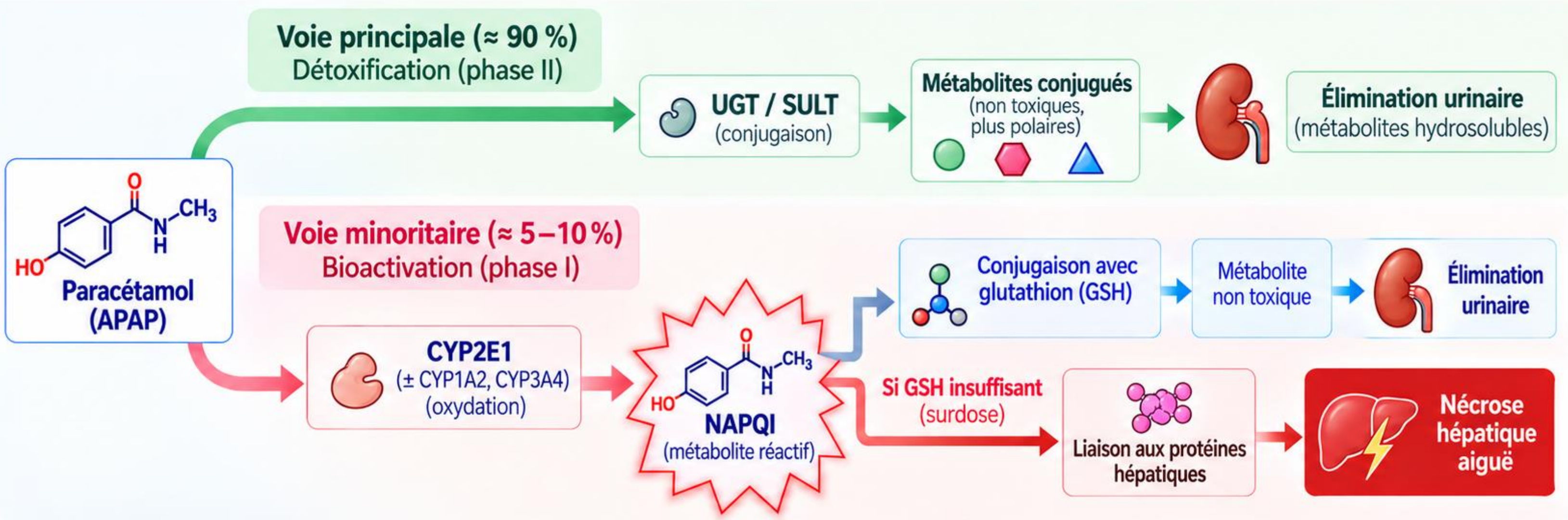
Message clé

La phase III permet l'export et l'élimination des métabolites conjugués, principalement vers la bile (P-gp, MRP2) ou les urines (MRP3).

4

Le Point de Bascule : Détoxification vs Bioactivation

Exemple : le métabolisme du paracétamol



Facteurs qui favorisent la détoxification

- Doses thérapeutiques
- Réserves normales de GSH
- Fonction hépatique normale

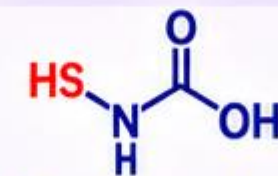


Facteurs qui favorisent la bioactivation

- Surdose de paracétamol
- Alcoolisme (induction CYP2E1)
- Jeûne, malnutrition (↓ GSH)
- Interactions médicamenteuses (inducteurs)



Antidote



N-acétylcystéine (NAC)

- Précurseur de glutathion
- À administrer précocement (idéalement < 8–10 h)

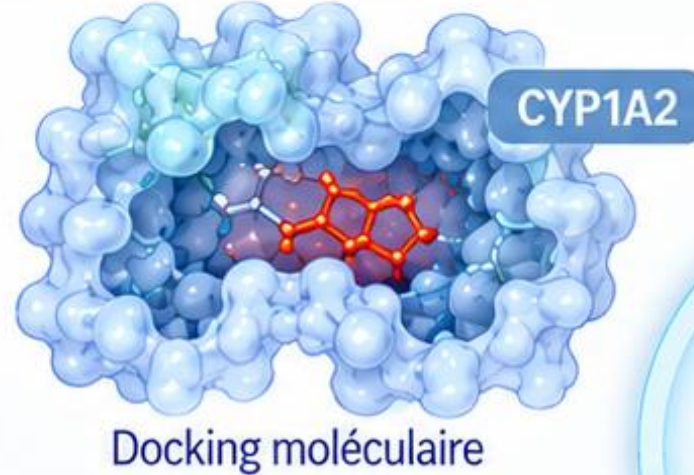
Étude de Cas Intégrative

Enquête sur une Hépatotoxicité Inconnue



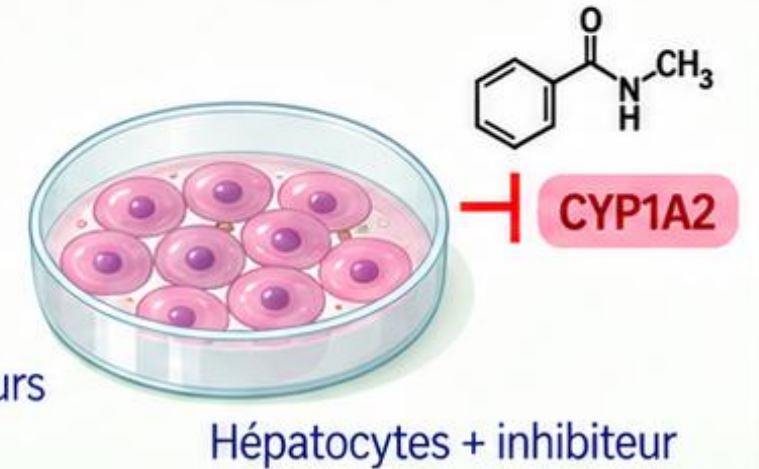
In Silico (L'Alerte)

- QSAR prédit une structure substrat du CYP1A2.
- Docking : forte affinité avec le site actif.
- Modélisation PBPK : risque d'accumulation hépatique.



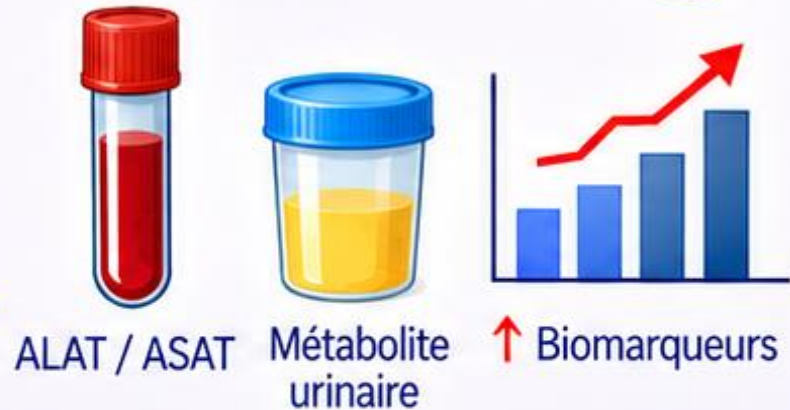
In Vitro (La Mécanique)

- Hépatocytes primaires.
- Inhibition de CYP1A2.
- Arrêt du métabolisme → accumulation du métabolite réactif.
- Augmentation des marqueurs de toxicité (viabilité ↓).



Biomarqueurs (La Surveillance)

- Tests ALAT/ASAT chez des travailleurs exposés.
- Dosage d'un métabolite urinaire spécifique.
- Augmentation significative par rapport aux témoins.



In Vivo (La Règle Finale)

- Étude subchronique chez le rat.
- Détermination du NOAEL.
- Évaluation histopathologique du foie.
- Établissement de la Valeur Toxicologique de Référence (VTR).



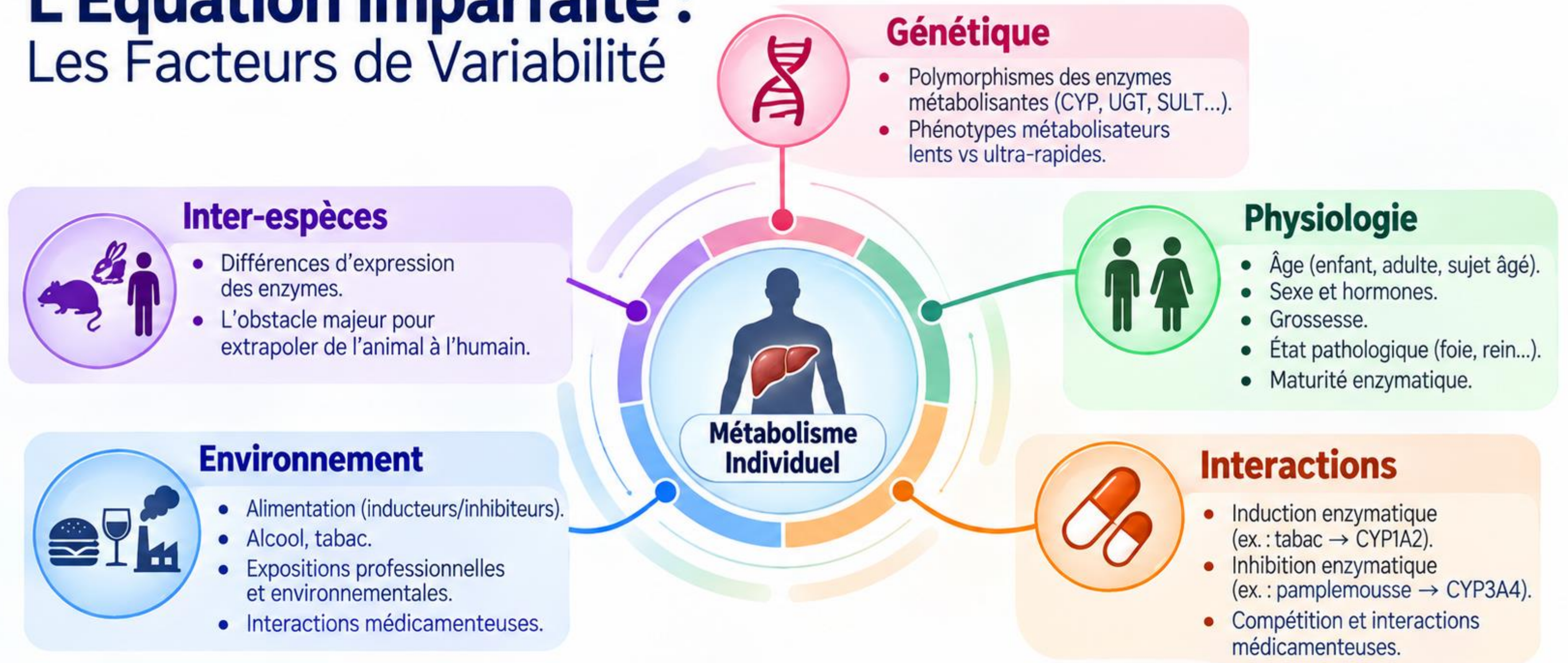
Suspect :
Nouvelle substance industrielle X



Message clé

L'approche intégrative (in silico → in vitro → biomarqueurs → in vivo) permet d'identifier, de comprendre et de confirmer le potentiel hépatotoxique d'une nouvelle substance.

L'Équation Imparfaite : Les Facteurs de Variabilité



Message clé

L'évaluation d'un xénobiotique **ne se lit pas sur sa seule structure chimique**,
mais dans son **interaction dynamique avec une biologie variable**.

L'intégration de toutes les méthodes (in silico → in vitro → biomarqueurs → in vivo) est la seule réponse à cette complexité.