

Préface

Un ouvrage sur les tests cellulaires, sujet au centre des évolutions et des enjeux scientifiques, techniques, sanitaires et économiques, méritait d'être mis à la portée du citoyen d'aujourd'hui. J'ai pensé que pour mieux comprendre l'importance de ce livre, ma propre expérience de chercheur et d'expert public pourrait apporter une vision de terrain au lecteur et donner un éclairage pratique au texte de l'ouvrage.

Vue du chercheur

Pour un chercheur en biologie de ma génération, ce sujet a sous-tendu toute ma carrière non seulement universitaire, mais aussi mon activité d'expert en évaluation des risques sanitaires liés à l'exposition aux substances chimiques. Il faut savoir que la découverte de la double hélice de l'ADN a valu à Watson et Crick le prix Nobel 1962, année où je rentrais en terminale, et que les docteurs Lwoff, Monod et Jacob ont reçu le prix Nobel pour leur découverte du rôle de l'ARN messager en 1965, ma première année à la Faculté des sciences de Toulouse. Cette actualité va dès lors alimenter ma passion pour la biochimie et orienter ma carrière de chercheur. En effet, les travaux des prix Nobel abordaient la mécanique de la vie par les réactions chimiques et leurs supports biologiques, passant ainsi à l'échelle moléculaire. Il faut savoir qu'à l'époque de mon initiation à la recherche, au cours de mon DEA en 1969, les expériences que nous pratiquions en physiologie étaient réalisées sur des animaux vivants anesthésiés, alors que les études *in vitro* se faisaient sur des organes isolés (estomac, intestin, cœur...) ou sur des coupes de tissus (cerveau, foie, reins...) maintenus en survie dans des ampoules en verre contenant des liquides physiologiques nutritifs, oxygénés et maintenus à 37 °C.

Avec le passage de la physiologie à la biochimie, on reproduisait les phénomènes vitaux au niveau moléculaire en utilisant ce que l'on appelait des systèmes a-cellulaires, c'est-à-dire des machines (mitochondries, réticulum endoplasmique...) et des pièces

(ARN messagers ou de transfert, acides aminés, cofacteurs énergétiques, enzymes...). Cependant, à étudier les différentes machines qui font fonctionner une cellule (production d'énergie, synthèse ou dégradation de molécules endogènes ou exogènes...), le biochimiste restait éloigné du fonctionnement de l'animal entier (ce que notre culture physiologique nous avait appris), mais aussi de la cellule comme entité biologique. En effet, les seuls à pratiquer couramment la culture de cellules étaient les généticiens, les microbiologistes ou les biologistes des algues qui travaillaient sur des espèces unicellulaires, bactéries ou levures, par exemple.

Au cours de ma thèse sur la régulation de la protéosynthèse chez le poisson, on voyait les publications se multiplier sur les cellules en culture, mais essentiellement à partir de lignées cancéreuses immortalisées qui avaient l'inconvénient d'avoir un métabolisme transformé par rapport aux cellules tissulaires. Des techniques faisant appel à des cellules isolées de leur tissu et maintenues en survie dans des milieux de culture avaient également été développées, mais leur état se dégradait rapidement et leur utilisation se limitait à quelques jours.

Ayant créé ma propre équipe de toxicologie biochimique du fait de mon implantation à Bordeaux, j'ai essayé au début des années 1980 d'acquérir ces techniques de culture, mais il fallait équiper le laboratoire en matériel spécialisé et reconvertir le personnel technique. Après quelques stages dans des laboratoires hospitaliers, nous avons renoncé. On ne pouvait pas, en France, adapter rapidement un laboratoire à de nouvelles techniques, suite aux difficultés pour réunir les budgets nécessaires, au corporatisme des chercheurs qui n'aiment pas le pluridisciplinaire, et aux difficultés de reconversion du personnel (on ne transforme pas facilement un animalier en spécialiste de culture cellulaire).

En revanche, abordant le domaine de la cancérogenèse chimique, il nous fallait absolument évaluer les potentiels génotoxiques et mutagènes des molécules étudiées. C'est ainsi que j'ai adjoint une nouvelle équipe dans mon laboratoire en installant le test de mutagenèse du Dr Ames qui utilisait des bactéries *Salmonella thyphimurium* modifiées, que ce chercheur de l'UCLA (Californie) pouvait nous fournir. Comme collaborateur, il me fallait un spécialiste des cultures bactériennes et c'est ainsi que j'ai pu recruter une assistante de microbiologie en déshérence de laboratoire qui était allée apprendre la technique spécifique à l'Institut du cancer à Villejuif. Nous pouvions ainsi travailler à la fois sur la cancérogenèse *in vivo* et sur la génotoxicité *in vitro* pour une même molécule. C'est cette complémentarité de techniques qui nous a ouvert des collaborations internationales et permis de publier dans de bonnes revues.

La deuxième évolution de mon groupe de recherche s'est déroulée presque 20 ans plus tard sur le thème des perturbateurs endocriniens. Ici aussi, une nouvelle équipe sur

ce sujet spécifique s'est adjointe au laboratoire avec le recrutement d'une maîtresse de conférences en endocrinologie et l'acquisition de la technique des cellules modifiées avec gènes rapporteurs et marqueurs fluorescents. On passait ainsi aux cultures cellulaires humaines et de mammifères. De plus, comme ces tests étaient compatibles avec l'utilisation des microplaques, il fallut acquérir un lecteur spécifique. Evidemment, le personnel technique dut effectuer une formation dans la structure commercialisant ces tests, en particulier ceux concernant la détection de substances de type dioxines ou de perturbateurs endocriniens de type oestrogènes. Il y avait une grande différence avec la première extension de notre groupe. Tout était devenu payant (lignées cellulaires, formation, royalties). Par ailleurs, la disponibilité de budgets publics s'étant raréfiée, l'opération n'avait été possible qu'avec l'aide d'une grande entreprise privée.

La troisième évolution a porté sur la miniaturisation des tests en écotoxicologie avec l'arrivée, à partir de 2010, d'un jeune directeur à la tête de mon équipe. Cela nous permettait de passer des études *in vivo* en aquarium sur mollusques et poissons aux techniques *in vitro* y compris sur microplaques en utilisant non seulement des cellules, mais aussi des larves ou embryons d'animaux aquatiques. On pouvait alors, par ces nouvelles techniques, multiplier les essais et mesurer de nouveaux paramètres de toxicité liés au comportement ou au développement.

Dans le même temps, les investissements nécessaires à l'adaptation des animaleries aux contraintes réglementaires sanitaires de plus en plus fortes se sont accrues. De fait, l'animalerie du laboratoire abritant des rats a été fermée il y a une vingtaine d'années. Au bilan, l'utilisation croissante des modèles cellulaires et des techniques *in vitro* s'est traduite par une diminution parallèle des essais animaux, et ce, même si les investissements matériels et de formation du personnel pour mettre en œuvre les tests cellulaires ont toujours été difficiles à mobiliser du fait de la décroissance depuis 30 ans des crédits publics.

Vue de l'expert

Comme expert public participant depuis 1988 à l'évaluation des risques sanitaires liés à l'exposition aux substances chimiques dans le cadre des instances nationales ou internationales, j'ai aussi été confronté à l'apparition des tests cellulaires dans le cadre réglementaire. Depuis les débuts de la toxicologie (sciences des poisons), il s'agissait d'utiliser certaines substances (toxicologie des médicaments) ou de définir les niveaux d'exposition à certaines substances (toxicologie alimentaire, environnementale ou professionnelle) qui ne déclenchent pas de maladie à plus ou moins long terme. Les pathologies se traduisant par des signes cliniques observés au niveau d'un individu, la démarche historique (gravée dans le marbre par l'OCDE) était essentiellement basée sur l'observation clinique réalisée en général sur des animaux modèles soumis à une

série de tests toxicologiques à court, moyen et long termes, et permettant de définir, chez l'homme, une *Dose journalière tolérable* (DJT). L'introduction de la notion de mécanisme d'action dans cette démarche est apparue avec le développement des connaissances en biologie moléculaire permettant de mieux comprendre la cascade d'événements liant la présence d'une entité chimique active à une pathologie.

C'est avant tout dans le domaine de la cancérogenèse que les tests cellulaires ont été intégrés dans le protocole OCDE. En fait, ces tests s'adressent à des cellules bactériennes (test d'Ames) ou sanguines (lymphocytes) et démontrent les effets génotoxiques (capables d'altérer le matériel génétique). Il s'agit donc de détecter la première étape d'un processus de cancérogenèse multi-étapes, qui se manifeste par l'apparition de tumeurs malignes *in vivo*. Or, la signification des termes cancérogène et génotoxique est différente puisque l'exposition à un génotoxique n'induit pas systématiquement l'apparition d'un cancer, de même que des composés peuvent induire des cancers sans être génotoxiques.

Le même problème se pose pour les perturbateurs endocriniens dont le mot décrit un mécanisme d'action et non une pathologie. La caractéristique de perturbateur endocrinien est déterminée surtout par la réponse à des tests cellulaires spécifiques et par l'application de modèles QSAR. En fait, ce mécanisme est impliqué dans de nombreuses pathologies (cancers hormonaux dépendants, altération des fonctions de reproduction, diabète, obésité...), mais il n'y a pas de lien de causalité systématique, l'expression de la pathologie dépendant des conditions d'exposition et de sensibilité...

Toute la discussion actuelle au sein des agences sanitaires et réglementaires tourne autour de l'intégration de l'approche cellulaire dans les processus d'évaluation des risques, d'autant que l'approche *in vivo* a montré de nombreuses limites techniques, économiques, temporelles et éthiques qui doivent nécessairement entraîner des changements profonds dans les méthodes d'évaluation des dangers et des risques dans lesquelles les tests cellulaires auront une large place.

L'auteur

Pour faire un livre, il faut aussi qu'un sujet d'actualité rencontre un rédacteur. La qualité de l'ouvrage dépend alors de la qualité de la pensée et, pour des sujets techniques, de l'expérience de l'auteur. Il se trouve que Christophe Furger a été étroitement associé aux développements de tests cellulaires au niveau du concept, du développement, des adaptations techniques, des applications, de la validation et même de la commercialisation. Sa grande culture, sa capacité d'intégration et son ouverture pluridisciplinaire lui permettent une vision historique et prospective ainsi que des avis techniques et scientifiques lui assurant une appréciation lucide sur la signification scientifique, les possibilités et les limites d'utilisation des tests cellulaires.

La clarté de la rédaction aidera le lecteur dans l'approche d'un sujet très technique dont tous les aspects sont abordés. Cet ouvrage sera indispensable aux étudiants, aux experts, aux ingénieurs, aux médecins et membres du corps médical, aux journalistes, aux défenseurs de l'environnement, aux défenseurs des animaux et plus généralement à tout citoyen éclairé. Je suis d'autant plus heureux de faire la préface de cet ouvrage que son creuset est Toulouse, pépinière de grands scientifiques, d'auteurs, de poètes et de musiciens, mais aussi de visionnaires et de militants. On retrouve tous ces ferments dans la genèse de cet ouvrage.

Jean-François NARBONNE
Toxicologue
Professeur à l'université Bordeaux 1