

Table des matières

Préface	13
Jean-François NARBONNE	
Introduction	19
Chapitre 1. Principe et positionnement	23
1.1. Principe des tests cellulaires	23
1.2. Domaines d'application	25
1.3. Positionnement.	27
1.3.1. Définition et typologie des tests cellulaires.	27
1.3.2. Dimension réglementaire et industrielle.	29
1.4. Marché	30
1.5. Avantages concurrentiels.	33
1.5.1. La cellule est un modèle vivant informatif	33
1.5.2. Accès au haut débit	33
1.5.3. Accès à l'analyse multiplexe	34
1.5.4. Accès à la miniaturisation	35
1.5.5. Accès à l'ingénierie moléculaire	35
1.5.6. Accès à la standardisation	35
1.6. La mesure sur cellules en culture est-elle extrapolable aux effets sur l'organisme ?	36
1.6.1. La toxicocinétique	36
1.6.2. Les composants du système immunitaire	37
1.6.3. La biotransformation	37
1.6.4. Le macro-environnement cellulaire	37

1.7. Limitations	38
1.7.1. Importance du micro-environnement cellulaire	38
1.7.2. Autres limitations	40
Chapitre 2. Historique et état de l'art	41
2.1. Origines de la culture cellulaire	41
2.1.1. Les études pionnières.	41
2.1.2. Alexis Carrel.	43
2.1.3. Les cellules du Dr Carrel étaient-elles immortelles ?	44
2.2. La lignée HeLa et les premières applications de la culture cellulaire.	47
2.2.1. Un vaccin contre la poliomyélite	48
2.2.2. Des cellules dans l'espace	49
2.2.3. Le clonage cellulaire	49
2.3. De nouvelles lignées cellulaires	50
2.3.1. La lignée CHO	50
2.3.2. Les lignées cellulaires se multiplient	50
2.4. Contaminations croisées	51
2.5. Les lignées cellulaires, un enjeu éthique.	54
2.6. Une première génération de tests cellulaires (1969-1983)	56
2.6.1. Le test du caryotype	56
2.6.2. Le test MTT	57
2.6.3. Le test NRU	59
2.7. La génotoxicité, première cible des tests réglementaires (1983-1986)	60
2.7.1. Test d'Ames (ligne directrice OCDE n° 471)	62
2.7.2. Essai d'aberration chromosomique sur cellules de mammifères (ligne directrice OCDE n° 473)	63
2.7.3. Essai de mutations géniques sur cellules de mammifères (ligne directrice OCDE n° 476)	63
2.7.4. Essai <i>in vitro</i> d'échange de chromatides-sœurs sur cellules de mammifère (ligne directrice OCDE n° 479)	64
2.7.5. Lésion et réparation d'ADN : synthèse non programmée de l'ADN sur cellules de mammifère (ligne directrice OCDE n° 482)	65
Chapitre 3. Technologies et modèles cellulaires	67
3.1. Fluorescence et bioluminescence	69
3.1.1. La GFP (<i>Green Fluorescent Protein</i>)	69
3.1.2. Le BRET (<i>Bioluminescence Resonance Energy Transfert</i>)	70
3.1.3. Le FRET (<i>Förster Resonance Energy Transfert</i>)	72
3.1.4. Autres applications des GFP	74

3.1.5. L'approche gène rapporteur	75
3.2. La variation d'impédance sur population cellulaire	77
3.3. Les signaux optiques modifiés par l'état des cellules	79
3.4. L'autofluorescence cellulaire	82
3.4.1. Le cas de la chlorophylle	83
3.5. Les différents modèles cellulaires et modes de culture disponibles	84
3.5.1. Les lignées immortalisées	85
3.5.2. Les cellules primaires	85
3.5.3. La culture cellulaire tridimensionnelle	86

Chapitre 4. La perte d'homéostasie cellulaire : applications à la mesure de toxicité

89

4.1. Quelles informations utiles exploiter dans une cellule vivante ?	89
4.2. L'activité lysosomale	91
4.3. Equilibre Redox et stress oxydatif	94
4.4. L'intégrité de la membrane plasmique	97
4.5. Efflux cellulaire	101
4.6. Homéostasie des échanges ioniques	106
4.6.1. L'ion calcium	106
4.6.2. Maintien du potentiel de membrane	108
4.7. Le métabolisme et l'activité respiratoire cellulaire.	109
4.8. La génotoxicité.	112
4.9. L'apoptose	113

Chapitre 5. Les alternatives aux tests animaux, un moteur pour le développement de tests cellulaires

121

5.1. De la pertinence des essais <i>in vitro</i>	122
5.2. De la pertinence des essais sur les animaux	123
5.3. Le problème de l'extrapolation	124
5.3.1. La barrière interspèce	124
5.3.2. L'exemple marquant du TGN1412.	125
5.4. L'évaluation toxicologique des substances	126
5.5. Irritation et corrosion de l'œil : la longue quête (inachevée) des alternatives au test de Draize.	128
5.5.1. Le test CM	129
5.5.2. Les approches <i>ex vivo</i>	131
5.5.3. Les modèles de culture 3D	132
5.5.4. Les démarches et validations récentes	133

5.6. Les alternatives à la mesure d'absorption, de corrosion et d'irritation cutanée (2004-2010)	133
5.6.1. Absorption cutanée : méthode <i>in vitro</i> (ligne directrice OCDE n° 428)	134
5.6.2. Les modèles de peau reconstituée pour la corrosion et l'irritation	134
5.6.3. Corrosion cutanée <i>in vitro</i> : essai sur modèle de peau humaine (ligne directrice OCDE n° 431)	135
5.6.4. Méthode d'essai <i>in vitro</i> sur membrane d'étanchéité pour la corrosion cutanée (ligne directrice OCDE n° 435)	138
5.6.5. Irritation cutanée <i>in vitro</i> : essai sur épiderme humain reconstitué (ligne directrice OCDE n° 439)	139
5.7. Le test cellulaire de mesure de la phototoxicité (2004)	139
5.8. Les tests de dépistage des perturbateurs endocriniens (2009-2011)	140
5.8.1. Détection des substances agonistes des récepteurs des œstrogènes (ligne directrice OCDE n° 455)	141
5.8.2. L'essai de stéroïdogénèse H295R (ligne directrice OCDE n° 456)	141
5.9. Les quatre derniers tests cellulaires validés (2012-2015)	142
5.9.1. Corrosion de l'œil : test de diffusion de la fluorescéine (ligne directrice OCDE n° 460)	142
5.9.2. Test du micronoyau sur cellules de mammifères (ligne directrice OCDE n° 487)	143
5.9.3. Méthode d'essai ARE-Nrf2 luciférase pour la sensibilisation cutanée (ligne directrice OCDE n° 442D)	143
5.9.4. Méthode d'essai pour l'identification des produits chimiques provoquant des lésions ou irritations oculaires (ligne directrice OCDE n° 491)	144

Chapitre 6. Validation et applications réglementaires 147

6.1. Court historique de l'évolution de la démarche de validation en Europe	147
6.2. Le processus de validation d'un test cellulaire	148
6.3. Les tests cellulaires adoptés par l'OCDE	150
6.4. L'avenir des tests cellulaires réglementaires : les programmes TOX21 et SEURAT	151
6.4.1. TOX21, un nouveau paradigme de l'évaluation du risque sanitaire et environnemental	152
6.4.2. Le programme SEURAT-1 (2011-2016)	155
6.5. Le cadre réglementaire REACH	157
6.5.1. L'approche d'évaluation par les éléments de preuve (WoE).	158

6.5.2. Le point sur l'utilisation des tests cellulaires sous REACH	158
6.5.3. Toxicité aiguë	159
6.5.4. Corrosion et irritation cutanée	159
6.5.5. Irritation et dommages sérieux de l'œil	160
6.5.6. Sensibilisation cutanée	160
6.5.7. Doses répétées (effets long terme)	160
6.5.8. Génotoxicité	160
6.5.9. Toxicité sur la reproduction (reprotoxicité).	161
6.5.10. Carcinogénicité	161
6.5.11. Bioaccumulation et toxicité chez le poisson	161
6.5.12. Toxicité long-terme et sur la reproduction chez l'oiseau	162
6.6. Mise en œuvre du 7 ^e amendement de la directive cosmétique	162
6.6.1. Toxicité aiguë	163
6.6.2. Corrosion et irritation de l'œil	163
6.6.3. Irritation et corrosion cutanée	163
6.6.4. Sensibilisation cutanée	163
6.6.5. Génotoxicité	164
6.6.6. Absorption cutanée	165
6.7. Sécurité alimentaire et directive biocides	165
6.7.1. Sécurité alimentaire.	165
6.7.2. La directive biocides	165

Chapitre 7. La signalisation cellulaire, au cœur des tests

fonctionnels pour l'industrie	167
7.1. Les récepteurs membranaires, première cible des médicaments	167
7.1.1. Evolution du concept de cible thérapeutique/récepteur	168
7.1.2. Purification, séquençage et expression hétérologue	169
7.1.3. Importance thérapeutique des récepteurs à sept domaines transmembranaires	170
7.2. Le second messenger, unité de base du test cellulaire fonctionnel	171
7.2.1. Le concept de second messenger.	171
7.2.2. Adénylyl cyclases et phosphodiésterases régulent la concentration en AMP cyclique	173
7.3. Le concept de transduction cellulaire.	174
7.3.1. La protéine kinase A, cible (presque) universelle de l'AMP cyclique	174
7.3.2. Décryptage des voies de transduction	175
7.3.3. Les protéines G, chaînon manquant de la transduction cellulaire . . .	177
7.3.4. Lien de la transduction avec l'expression génique.	178
7.4. Les voies de transduction utilisées dans le cadre des tests cellulaires . . .	179

7.4.1. Premier niveau de régulation : activation de la voie de transduction	180
7.4.2. Deuxième niveau de régulation : désensibilisation et recyclage.	181
7.4.3. Troisième niveau de régulation : modulation allostérique	182

Chapitre 8. Applications à la découverte de nouveaux médicaments 183

8.1. Le criblage à haut débit, segment majeur du marché des tests cellulaires	183
8.1.1. Place des tests cellulaires dans les programmes de criblage	185
8.1.2. L'apport des tests cellulaires fonctionnels	186
8.1.3. Exploitation des voies de transduction	187
8.2. Mesures dans l'environnement immédiat du récepteur	188
8.2.1. Les tests sur récepteurs.	188
8.2.2. Les tests de mesure de l'activité β -arrestine	189
8.3. Mesure de l'AMP cyclique.	192
8.3.1. Les tests AMP cyclique classiques sur lysats cellulaires	192
8.3.2. Les tests AMP cyclique sur cellules vivantes en culture	194
8.4. Mesure de la voie PKC et discrimination des voies PKA/PKC	196
8.4.1. Les tests de mesure de l' IP_3	196
8.4.2. Les tests de mesure du Ca^{++}	197
8.4.3. Discrimination des voies AMP cyclique et IP_3/Ca^{++} par les méthodes <i>label-free</i>	198
8.5. Mesure des signaux distaux	199
8.6. Tests cellulaires concernant les autres cibles thérapeutiques	199
8.6.1. Mesure sur les canaux ioniques.	199
8.6.2. Mesure sur récepteurs tyrosine kinases (RTK).	201
8.7. La pharmacocinétique (ADME) <i>in vitro</i>	205
8.7.1. M comme métabolisme	205
8.7.2. A comme absorption	207
8.7.3. T comme toxicité	208

Chapitre 9. Impact sur la santé et l'environnement 211

9.1. Le diagnostic pour le patient.	211
9.1.1. Cytogénétique	212
9.1.2. Diagnostic de la tuberculose	213
9.1.3. Tests cellulaires de détection des substances pyrogènes	215
9.1.4. Tests cellulaires de prédiction d'efficacité en chimiothérapie	217
9.2. Les programmes militaires.	218

9.2.1. Détection et criblage d'inhibiteurs de la toxine botulinique	218
9.2.2. Tests de neutralisation de toxines par anticorps (TNA) : application à l'anthrax et à la ricine	221
9.2.3. Mesure de potabilité de l'eau sur site	222
9.3. Pollution et qualité de l'environnement	224
9.3.1. Le test MicroTox	225
9.3.2. Test de mobilité des daphnies (ligne directrice OCDE n° 202). . . .	226
9.3.3. Test sur embryon de poisson-zèbre (ligne directrice OCDE n° 236).	226
9.3.4. Test DR CALUX	227
9.3.5. <i>Biomonitoring</i> et problématique terrain	228
Chapitre 10. Perspectives	231
10.1. Les cellules souches, une opportunité pour le futur des tests cellulaires	231
10.2. Les biopuces organotypiques (<i>organs-on-a-chip</i>)	234
10.2.1. Homo chippiens	236
10.2.2. L'apport des modèles PBPK.	238
10.3. Conclusion	238
Liste des abréviations	241
Liste des tests cellulaires	243
Bibliographie	247
Index	263