

T. PINEAU

INRA, Unité de Pharmacologie
et Toxicologie,
180, Chemin de Tournefeuille,
31931 Toulouse Cedex

Développement actuel des techniques de pharmacologie et toxicologie à l'INRA

Evaluer une substance pharmacologique consiste non seulement à définir ses effets et son métabolisme, mais aussi à prendre en compte l'activité et la toxicité éventuelles des métabolites qui en sont issus. L'utilisation des biotechnologies, de la transgénèse notamment, a conduit à la création de modèles cellulaires et animaux permettant d'effectuer de telles études.

Lors des deux dernières décennies, la nature des investigations menées en toxicologie et pharmacologie ainsi que les méthodes utilisées ont connu de considérables modifications liées à des exigences accrues et à un acquis biotechnologique sans précédent. Les progrès méthodologiques fondamentaux, la rationalisation et l'automatisation des protocoles techniques utilisés en toxicologie, ont conféré une fiabilité appréciable aux études d'évaluation de la toxicité intrinsèque, menée systématiquement dans la phase de développement des médicaments, des cosmétiques, des additifs alimentaires et des produits phytosanitaires.

Des paramètres nouveaux ayant été progressivement introduits dans la définition de l'innocuité d'une molécule, le défaut de toxicité intrinsèque du produit ne constitue plus une garantie suffisante. L'évaluation d'un xénobiotique (substance étrangère à l'organisme) prend désormais en considération la nature de son métabolisme et les paramètres qui le modulent, jusqu'à son élimination ou son inactivation. Il convient donc d'apprécier, de surcroît, l'activité et la toxicité des métabolites issus du composé initial. Un exemple, pris dans la pharmacopée vétérinaire, illustre précisément cette nécessité nouvelle : le fébantel,

un antiparasitaire, est administré à l'état de prodrogue. Deux étapes d'activation enzymatique produisent un métabolite pharmacologiquement actif, l'oxfendazole, qui est métabolisé secondairement en composés inactifs éliminés.

1 / Des objectifs redéfinis

La prise de conscience, dans les pays industrialisés, des menaces potentielles pesant sur l'hygiène et la santé publiques ou l'environnement a créé des exigences nouvelles qui incombent légitimement à un institut tel que l'INRA. Des contraintes réglementaires nationales et supranationales ont complété le cahier des charges relatif aux médicaments vétérinaires et aux produits d'élevage et produits agrochimiques. Parfois, le débat public s'enrichit de nuances éthiques et culturelles lorsque sont abordés des sujets comme l'amélioration des performances zootechniques par usage d'hormones ou encore l'altération orientée du patrimoine génétique d'espèces animales ou végétales. Sur de tels sujets, des opinions parfois sans nuance et des intérêts économiques considérables s'affrontent.

En évaluant de manière exhaustive les risques toxiques engendrés par une molécule ou ses métabolites, le scientifique contribue à la prise des décisions réglementaires éclairées, par l'autorité administrative. Ces risques peuvent avoir des répercussions très concrètes, pour la santé publique ou pour l'environnement, comme l'attestent les exemples suivants :

- l'usage de diéthylstilbestrol, promoteur de la croissance chez les bovins, a provoqué en

Résumé

L'administration de toute substance chimique à l'animal doit se faire sans risque pour sa santé et doit préserver totalement la santé du consommateur. Pour satisfaire à ces critères exigeants de sécurité, il est devenu primordial de prédire, avec précision, le devenir de ces substances dans l'organisme et d'en apprécier les capacités toxiques. Nous évoquerons les plus récents apports des biosciences permettant d'atteindre cet objectif. Nous présentons des modèles biologiques génétiquement optimisés (*in vitro* et *in vivo*) particulièrement adaptés à ces tâches.

1980 la contamination d'aliments pour bébés à base de viande de veau, en Italie du nord, engendrant des cas de gynécomastie chez les enfants (Maghuin-Rogister 1995) ;

- les avermectines, universellement administrées chez les espèces d'élevage pour lutter contre certains parasites et insectes, subsistent à des concentrations pharmacologiquement actives dans les fèces des animaux traités. La biodégradation des excréments est entravée et le produit actif s'accumule. Sa présence dans l'environnement interfère alors avec la reproduction des insectes et constitue un facteur de risque écotoxicologique (Herd 1995).

2 / Des moyens adaptés

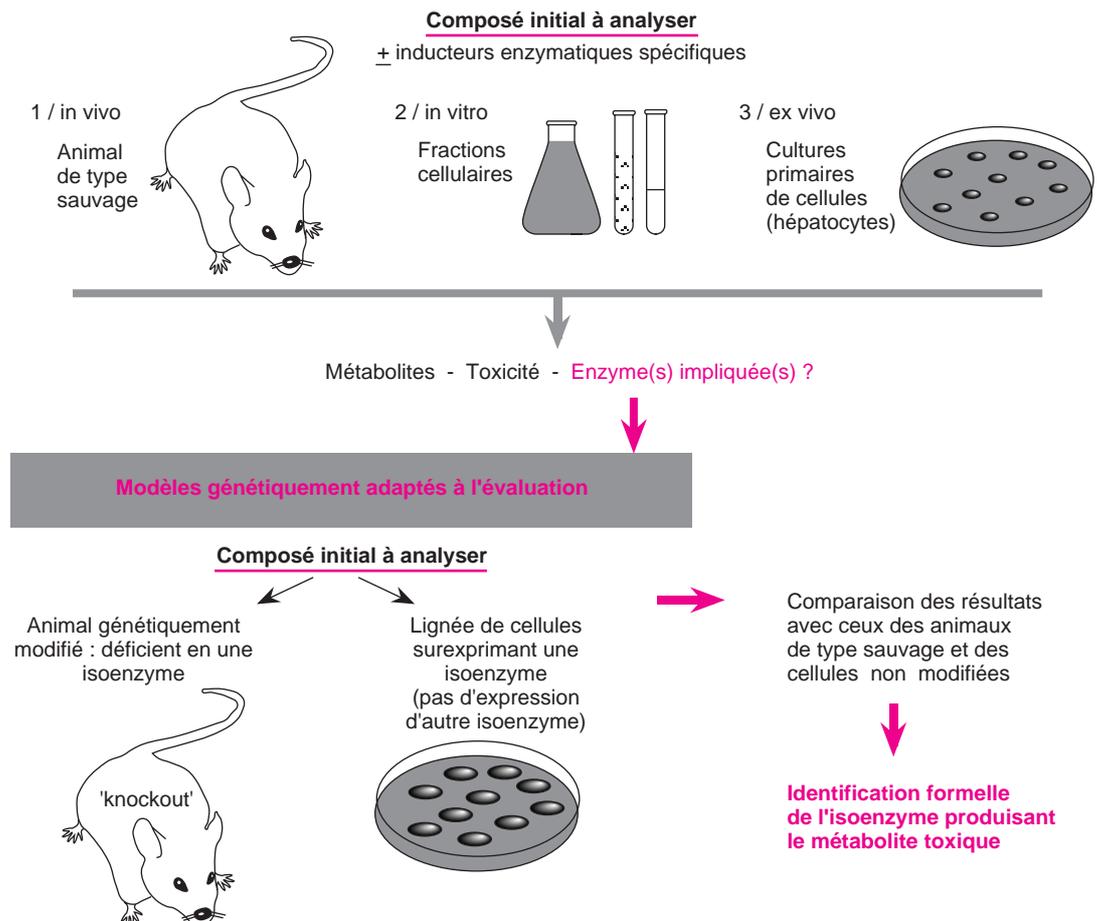
L'émergence de stratégies nouvelles dans l'étude du potentiel toxique des xénobiotiques a rendu nécessaire le développement de moyens d'investigation pertinents qui satisfont à des critères techniques et économiques. Concernant le médicament, les études *in vivo* à grande échelle chez les espèces d'élevage sont limitées en raison de leur coût. Des

modèles fiables ont été développés qui permettent d'étudier, isolément ou en conjonction, l'activation moléculaire et la survenue d'effets toxiques. L'usage des biotechnologies a permis de circonscrire à des effecteurs moléculaires précis les capacités métaboliques de ces modèles, rendant possible et rationnel le criblage systématique de molécules en séries. Les premiers modèles développés ont été cellulaires puis, sur la base des apports fondamentaux des technologies transgéniques, des modèles spécifiques de souris génétiquement modifiées sont apparus en 1995 (figure 1).

Les acteurs de l'activation moléculaire : production de métabolites toxiques

Dans l'organisme, l'intestin, le poumon, le rein et particulièrement le foie recèlent des enzymes impliquées dans le métabolisme et l'excrétion des xénobiotiques. Les enzymes de phase I, dites de fonctionnalisation, réalisent majoritairement des hydroxylations de leurs substrats, permettant l'action secondaire des enzymes de phase II, dites de conjugaison, qui greffent des fonctions hydrosolubles pour

Figure 1. Approches utilisées pour identifier formellement une isoenzyme responsable du métabolisme d'une molécule et de la formation d'un métabolite toxique. La détection des métabolites toxiques formés lors de tests utilisant des animaux, des cellules ou des microsomes (fragments de cellules) normaux définissent une présomption d'implication. Des modèles génétiquement altérés sont conçus pour évaluer formellement le degré de responsabilité de l'isoenzyme dans ce processus d'activation moléculaire.



favoriser l'élimination du xénobiotique. Ces enzymes furent sélectionnées au cours de l'évolution pour le profit de l'hôte qui les exprime. L'environnement chimique des mammifères ayant évolué plus rapidement que leurs facultés adaptatives, on observe que ces enzymes de détoxification peuvent malencontreusement activer des protoxiques en toxiques.

C'est le cas avec les différentes isoformes des cytochromes P450 hépatiques (protéines à fonction enzymatique) qui peuvent activer *in situ*, dans l'hépatocyte, des procarcinogènes synthétiques (dioxines) ou naturels (aflatoxine B1, ochratoxine A).

3 / Apport des modèles cellulaires génétiquement optimisés

Les modèles cellulaires recombinants sont conçus pour simplifier les conditions du métabolisme *in vivo*. Cette stratégie vise à déceler la responsabilité d'une isoforme enzymatique particulière dans le métabolisme des xénobiotiques et l'activation moléculaire résultante. Tous les modèles actuellement disponibles possèdent deux caractères communs : il s'agit de cellules entretenues en lignée, qui n'expriment pas l'isoforme considérée, avec des capacités métaboliques intrinsèques extrêmement limitées.

Les potentialités scientifiques et économiques de tels modèles ont permis la création d'entreprises commerciales spécialisées dans la réalisation et la diffusion de telles cellules. D'importantes firmes agroalimentaires ont créé des filiales internes pour produire des lignées métaboliquement compétentes et tester leurs propres xénobiotiques afin d'en prédire métabolisme et toxicité. Nous illustrerons deux approches qui diffèrent dans la nature du paramètre évalué en réponse au métabolisme du xénobiotique testé :

- l'objectif est principalement analytique avec l'évaluation du composé initial ou de ses métabolites ;

- l'objectif est toxicologique avec la détection, dans la cellule métaboliquement compétente, de l'effet toxique produit par un métabolite.

3.1 / Modèles cellulaires à visée analytique

Des outils nouveaux sont disponibles afin d'apprécier, pour un xénobiotique (souvent un médicament original), les isoenzymes spécifiquement responsables de son métabolisme, la part de ces voies dans le métabolisme global de la molécule et le niveau d'activité rémanente ou de toxicité due aux métabolites formés. Plusieurs modèles ont été conçus : cellules d'hépatome humain HepG2 transformées par le virus recombinant de la vaccine ou fibroblastes embryonnaires de souris (C3H/10T1/2) transformés par des vecteurs

rétroviraux. Mais, pour des raisons de commodité et de sécurité d'utilisation, les modèles développés par Crespi (1991) connaissent la diffusion la plus large. Il s'agit de cellules lymphoblastoïdes-B humaines recombinantes, transformées par des vecteurs d'expression de la protéine qui confèrent de surcroît la résistance à l'hygromycine B ou au 1-histidinol.

3.2 / Modèles cellulaires à visée toxicologique

Dans le cadre d'un projet européen AIR2 ont été optimisées des cellules surexprimant spécifiquement des enzymes de phase I et II (Macé *et al* 1994). La lignée cellulaire de base (BEAS-2B) est une lignée épithéliale humaine immortalisée par l'antigène T du virus SV40. Cette cellule exprime certaines enzymes de phase II mais n'exprime aucune enzyme de phase I. Des cellules définitivement transformées de cette lignée ont été sélectionnées à la suite de l'intégration d'un plasmide d'expression de divers cytochromes P450 porteur d'un élément de résistance à la néomycine.

De nombreux cytochromes P450 ont été isolément exprimés dans ces cellules (CYP1A, 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 3A...). Les conséquences de l'activation moléculaire de procarcinogènes variés ont été démontrées en appréciant directement la toxicité sur les cultures cellulaires. Le niveau de toxicité lié à l'exposition à l'aflatoxine B1 dans les cellules exprimant CYP1A2 est identique à celui dans les cellules témoins pour des doses de toxine 420 fois inférieures. Des paramètres affectant l'ADN peuvent être évalués, comme conséquence de l'activité *in situ* des métabolites potentiellement mutagènes. Ainsi le degré de formation des complexes chimiques à l'ADN ou la fréquence des mutations dans le locus HGPRT est considérablement augmenté dans les cellules exprimant CYP1A2 traitées par 100 ng/ml d'aflatoxine BI durant 24 heures.

Dans le cadre de l'action concertée Flair n° 8, ce sont des cellules V79 de hamster chinois qui ont été utilisées. Elles sont un indicateur de mutagenèse universellement utilisé en raison de toutes les facilités technologiques qu'elles présentent. Leur déficience métabolique les a prédisposées à la supplémentation génétique en cytochrome P450. Ces lignées sont activement exploitées pour préciser l'importance de l'étape d'activation moléculaire de toxines (aflatoxine BI), de procarcinogènes chimiques (benzo(a)pyrène, 2-acétylamino-fluorène) et de médicaments (cyclophosphamide) (Doehmer et Greim 1992).

La lignée métaboliquement compétente « MCL5 », qui exprime cinq cytochromes P450 et l'époxyde hydrolase microsomale, a été utilisée pour l'évaluation du pouvoir mutagène du benzo(a)pyrène (BP) et de quatre de ses dérivés. Les tests de mutagenicité ont été réalisés en parallèle selon la technique du test d'Ames. Pour s'avérer positif au test d'Ames, tous les composés testés ont dû impérativement subir une activation moléculaire obtenue par incubation préalable avec des

La possibilité de supprimer, chez un animal, un gène codant pour une enzyme permet de s'assurer du rôle de cette enzyme dans le métabolisme d'une molécule.

extraits de foie de rat. L'activité mutagène la plus élevée est obtenue avec une molécule 50 fois plus active que le BP dans la cellule de mammifère et seulement 1,6 fois plus active que le BP chez *Salmonella*. Un isomère du BP, négatif au test d'Ames, s'est révélé notablement mutagène dans cette lignée métaboliquement compétente. Il apparaît donc que de tels modèles, sans présenter de garantie absolue, contribuent à une évaluation plus complète et plus discriminante du potentiel toxique des xénobiotiques en intégrant le caractère spécifique de l'activation moléculaire enzymatique.

4 / Apport des technologies de transgénèse murine

A ce jour les travaux ont essentiellement concerné les enzymes de fonctionnalisation, particulièrement les cytochromes P450 susceptibles d'activer *in situ* des molécules protoxiques (médicaments, polluants de l'environnement, mycotoxines). Ces travaux ont porté sur les enzymes ainsi que les récepteurs cytosoliques et nucléaires qui contrôlent transcriptionnellement le niveau d'expression de ces enzymes de fonctionnalisation.

La stratégie transgénique de suppression a été privilégiée (« knockout »), car elle permet de clarifier le degré d'implication d'une isoenzyme particulière dans un métabolisme, par comparaison à l'animal de type sauvage. L'INRA a pris une part active dans le développement de ces modèles transgéniques de déficiences contrôlées du métabolisme, puisque c'est dans le cadre d'un séjour post-doctoral financé par l'Institut qui fut constitué dans un laboratoire du National Cancer Institute (Bethesda, USA) le groupe qui, en 1995, publia les tous premiers résultats portant sur cinq lignées knockout originales. Les retombées de cette collaboration sont particulièrement fructueuses puisque les lignées, hébergées désormais au centre de recherche INRA de Toulouse sont exploitées pour l'évaluation de médicaments vétérinaires, de mycotoxines et de xénobiotiques variés.

4.1 / Modèles murins déficients en cytochromes P450 et récepteurs associés

Les travaux initiaux ont concerné des isoformes de l'enzyme exprimées dans le foie, impliquées dans l'activation de procarcinogènes en carcinogènes.

a / Modèle déficient en cytochrome P450 1A2 (CYP 1A2)

Le cytochrome CYP 1A2 active des hydrocarbures polycycliques aromatiques procarcinogènes (polluants atmosphériques, fumée du tabac, produits de carbonisation des protéines, viandes et poissons fumés) et des mycotoxines (ochratoxine A). Un polymor-

phisme d'expression affecte la production de la protéine (jusqu'à 40 fois chez l'Homme). Celle-ci peut être considérablement augmentée dans divers tissus (foie, poumon, rein...) lors de l'exposition à des hydrocarbures aromatiques halogénés (dioxines, polychlorobiphényles...). Un degré élevé d'expression de l'enzyme, d'origine physiologique ou consécutif à un contact avec un inducteur, peut donc constituer, chez l'Homme, un risque majoré d'activer *in situ* des procarcinogènes. Il convient donc de détecter toute substance, en contact avec l'Homme et les animaux, spécifiquement métabolisée par le CYP 1A2 et d'apprécier la toxicité des métabolites ainsi générés. Il est également souhaitable d'identifier les substances spécifiquement inductrices de l'enzyme afin de prévenir l'exposition humaine.

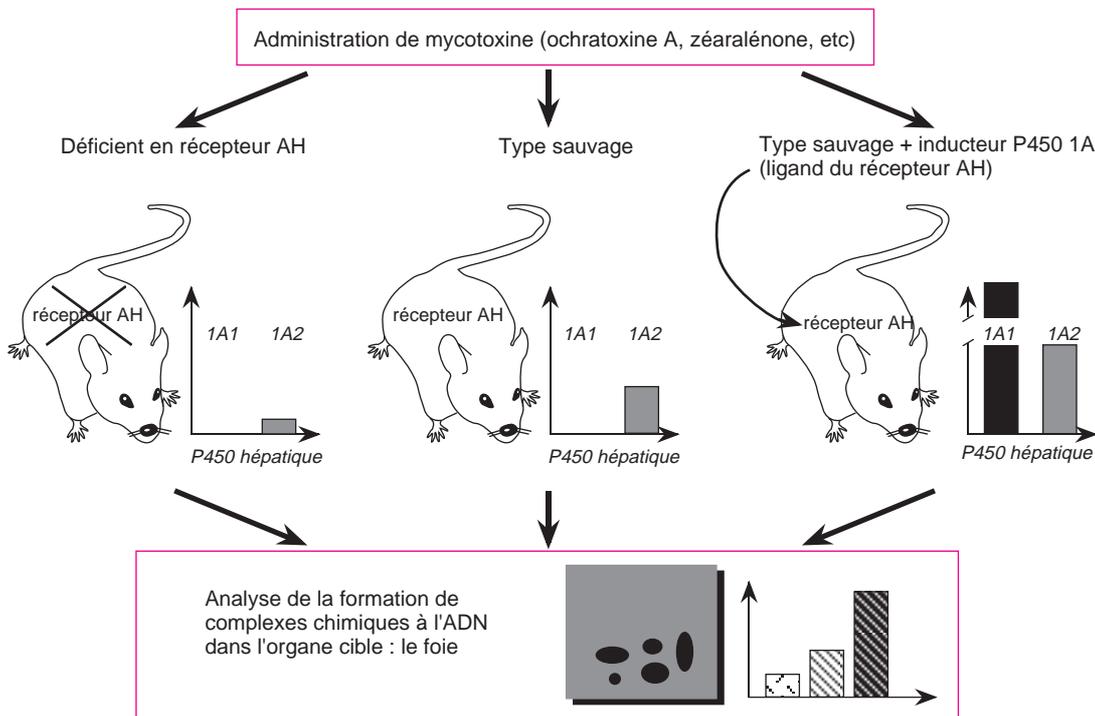
A ces fins, nous avons conçu un modèle murin génétiquement déficient en CYP 1A2 (Pineau *et al* 1995, Buters *et al* 1996). Les souris « 1A2 knockout » n'expriment plus la protéine. Elles constituent un modèle de choix pour l'étude des métabolismes inféodés au CYP 1A2 si on compare leurs résultats à ceux obtenus chez des animaux de type sauvage non traités ou préalablement traités par un inducteur spécifique des CYP 1A.

La valeur de ce modèle d'animal génétiquement altéré a été confirmée par une étude de métabolisme portant sur la caféine, une molécule suspectée de longue date d'être métabolisée par le CYP 1A2. Les animaux déficients et les témoins de type sauvage présentent des niveaux de créatinine, de transaminases hépatiques et de phosphatase alcaline rigoureusement comparables. Il en est de même pour les niveaux d'expression en enzymes de phase I. De la sorte, les différences métaboliques observées sont effectivement dues au profil différentiel d'expression du seul CYP 1A2. La demi-vie de résidence de la caféine est augmentée de 7,4 fois chez les animaux déficients et son élimination 8 fois plus lente. Il a été établi que cette isoenzyme particulière est responsable à 87 % du métabolisme de la molécule et de l'élimination qui en découle, les 13 % restants étant dus à d'autres isoenzymes. Les résultats permettent d'établir que, concernant les isoformes CYP 1A2 murines et humaines, extrêmement proches en termes de structure, de séquence ADNc et d'activités catalytiques, le modèle murin déficient a une forte valeur prédictive d'un déficit similaire chez l'Homme.

b / Modèle déficient en récepteur AH

Un modèle déficient en récepteur AH a été produit (Fernandez-Salguero *et al* 1995), il est tout à fait complémentaire du modèle déficient en CYP 1A2. Le récepteur cytosolique AH exerce un contrôle transcriptionnel sur une batterie de gènes incluant les gènes des cytochromes P450 1A (1A1, 1A2). On observe que le développement hépatique est perturbé par la carence en récepteur AH ; la masse du foie chez l'animal mutant ne repré-

Figure 2. Protocole INRA - ENSAT en cours : étude de formation des complexes chimiques à l'ADN hépatocytaire en réponse à l'activation *in situ* d'une mycotoxine par les CYP 1A. L'usage des animaux déficients en récepteur AH permet d'évaluer, par rapport à un animal de type sauvage, le niveau d'activation dans des conditions d'expression très faible des CYP 1A.



sente que 50 % de la masse normale de l'organe. En termes métaboliques, les animaux mutants présentent un niveau basal d'expression CYP 1A1 et 1A2 très amoindri par rapport aux souris normales. CYP 1A2 étant la forme constitutivement exprimée dans le foie alors que les deux formes 1A1 et 1A2 y sont inducibles, il est possible de concevoir des protocoles combinant l'usage d'animaux déficients, normaux et normaux induits pour définir clairement le degré de responsabilité de chaque isoenzyme dans l'activation moléculaire d'un protoxique. C'est ce qu'illustre la figure 2, où, dans une étude destinée à caractériser *in vivo* la toxicité de l'ochratoxine A, nous observons le degré de formation des complexes chimiques à l'ADN hépatocytaire comme marqueur du niveau d'activation moléculaire *in situ*. Ce paramètre varie en fonction du degré d'expression du cytochrome et de sa nature.

Les animaux déficients en récepteur AH servent également un autre objectif. Grâce à eux, nous progressons dans la compréhension du mécanisme moléculaire d'induction des CYP 1A qui activent certains procarcinogènes. Une collaboration entre deux équipes de l'INRA (Toulouse-Dijon) a permis d'identifier des inducteurs de CYP 1A originaux, colorants alimentaires de structure voisine de la vitamine A, qui n'exercent pas de compétition avec les sites de liaison connus du récepteur et, cependant, qui ne sont inducteurs de CYP 1A1 et 1A2 qu'en présence du récepteur. Nous sommes donc amenés à évaluer un hypothétique mode d'activation alternatif du

récepteur AH, n'impliquant pas le traditionnel site de fixation aux hydrocarbures polycycliques. Cette approche pourrait aussi servir à proposer un mécanisme d'action des benzimidazoles antiparasitaires qui partagent cette même faculté d'induction des cytochromes P450 1A sans liaison au récepteur AH (Aix *et al* 1994).

5 / Perspectives

Les quelques avancées méthodologiques évoquées dans ce texte permettent d'envisager l'utilisation systématique de ces nouveaux modèles pour caractériser le métabolisme des xénobiotiques et identifier leurs métabolites. Les études pharmaco-toxicologiques vont grandement bénéficier des modèles cellulaires et animaux spécifiquement déficients ou de surexpression, qui sont en voie d'être produits dans de nombreux laboratoires. Cependant, de nouvelles avancées sont nécessaires, particulièrement pour satisfaire aux nécessités propres de l'INRA. Il est de notre responsabilité de nous doter des outils moléculaires permettant d'évaluer les potentiels métaboliques d'espèces de rente sur lesquelles l'expérimentation de masse demeure difficile. Ces outils seront indispensables dans la prédiction de l'activité des médicaments vétérinaires, dans l'évaluation de leur impact sur l'environnement et dans le contrôle de la qualité initiale du produit alimentaire avant ses étapes de transformation.

L'utilisation d'animaux de type sauvage, génétiquement modifiés ou pharmacologiquement induits permet de discriminer *in vivo* les isoenzymes responsables de l'activation d'une molécule.

Il serait souhaitable de corrélérer ces efforts avec les avancées les plus récentes obtenues en biologie structurale. La connaissance détaillée des sites actifs des enzymes du métabolisme et

des récepteurs pharmacologiques associés peut considérablement aider à la prédiction du métabolisme et de l'activité des médicaments futurs et guider utilement leur conception.

Références bibliographiques

Aix L., Rey-Grobelet X., Larrieu G., Lesca P., Galtier P., 1994. Thiabendazole is an inducer of cytochrome P4501A1 in cultured rabbit hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 202, 1483-1489.

Buters J.T.M., Tang B.K., Pineau T., Gelboin H.V., Kimura S., Gonzalez F.J., 1996. Role of CYP1A2 in caffeine pharmacokinetics and metabolism: studies using mice deficient in CYP1A2. *Pharmacogenetics*, 6, 291-296.

Crespi C.L., 1991. Expression of cytochrome P450 cDNAs in human B lymphoblastoid cells : applications to toxicology and metabolite analysis. *Meth. Enzymol.*, 206, 123-129.

Doehmer J., Greim H., 1992. Cytochromes P450 in genetically engineered cell cultures. In : H. Greim and J.B. Sshenkman (eds), *Handbook of experimental pharmacology : cytochromes P450*. Springer Verlag, Heidelberg.

Fernandez-Salguero P., Pineau T., Hilbert D.M., McPhail T., Lee S.S.T., Kimura S., Nebert D.W., Rudikoff S., Ward J.M., Gonzalez F.J., 1995. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah Receptor. *Science*, 268, 722-726.

Herd R., 1995. Endectocidal drugs : ecological risks and counter-measures. *Int. J. Parasitol.*, 25, 875-885.

Macé K. *et al*, 1994. Activation of promutagens in a human bronchial epithelial cell line stably expressing human cytochrome P450 1A2. *Mol. Carcinog.*, 11.

Maghuin-Rogister G., 1995. Actualités en matière de résidus de substances à effet hormonal ou anti-hormonal. *Ann. Méd. Vét.*, 139, 319-323.

Pineau T., Fernandez-Salguero P., Lee S.S.T., McPhail T., Ward J.M., Gonzalez F.J., 1995. Neonatal lethality associated with respiratory distress in mice lacking cytochrome P450 1A2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 5134-5138.

Abstract

Update on pharmacological and toxicological technologies at INRA.

Administration of any chemical to animals should preserve its own health and should be totally safe for consumers. To comply with safety criteria, it became crucial to precisely predict the future of these molecules in the body and to define their

toxic potencies. We will present biotechnologies that can help to reach that goal. We present genetically engineered models (*in vitro* et *in vivo*) suitable for these tasks.

Pineau T., 1998. Développement actuel des techniques de pharmacologie et toxicologie à l'INRA. *INRA Prod. Anim.*, 11, 95-100.