



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de Biologie Animale



CYTOTOXICITÉ

Dr DAHMANI D I

INTRODUCTION

- La cytotoxicité est la propriété d'un agent toxique à détruire des cellules vivantes, par exemple : les médicaments cytostatiques.
- Les tests de cytotoxicité in vitro ont été mis au point comme méthode alternative à la manipulation sur les animaux (rongeurs, lapin, cochon,...).
- De nos jours de nombreuses firmes de biotechnologie et dans nombreuses publications, les scientifiques ont recours à ces tests **afin de valider de nouvelles molécules.**
- Les droits des animaux commencent à être sérieusement pris en compte de part le monde. Il est bon néanmoins de signaler que l'animal sera pour le moment toujours nécessaire lors des tests ultimes avant le passage à l'homme.

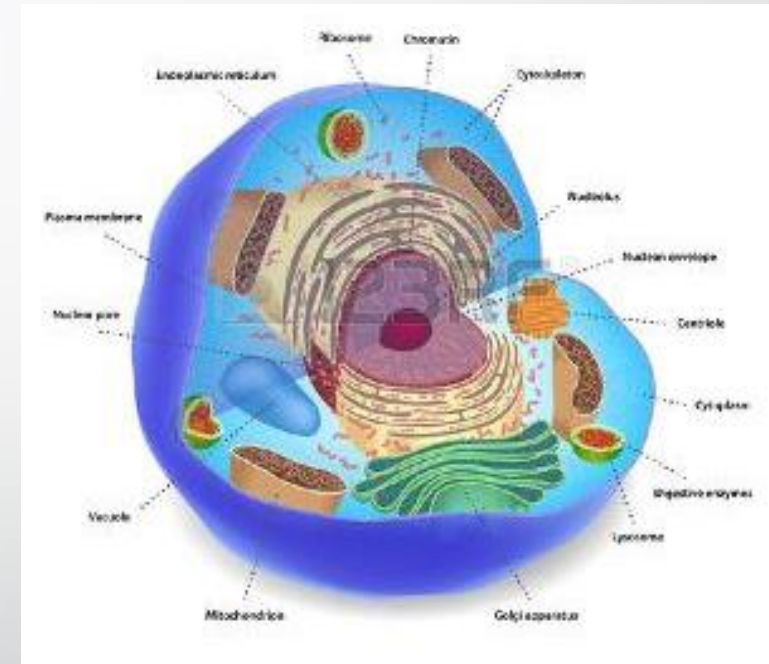
INTRODUCTION

- La toxicité d'un agent chimique est caractérisée par une modification moléculaire initiale et une altération fonctionnelle des cellules pouvant être qualifiées de rupture d'homéostasie.
- Ce dysfonctionnement peut engendrer des lésions cellulaires et dans le cas extrême conduire à la mort de la cellule.
- La lésion cellulaire est l'atteinte fonctionnelle et structurelle des cellules liée à une séquence d'événements apparaissant lorsque la cellule a dépassé ses possibilités d'adaptation face à un stimulus.
- Les lésions cellulaires peuvent être réversibles, c'est le cas de la dégénérescence cellulaire, ou irréversible c'est le cas de la mort cellulaire. La mort cellulaire peut arriver suite à deux processus différents : la nécrose et l'apoptose.

Cibles biologiques de l'action des cytotoxiques

1- Les membranes cellulaires peuvent être le siège d'altérations diverses telles que la peroxydation lipidique, la perte de la perméabilité sélective de la membrane plasmique.

2- Les mitochondries, ces toxiques inhibent la phosphorylation oxydative, la bêtaoxydation des acides gras, la respiration cellulaire, et par conséquent, entraînent une chute de la concentration en ATP.



Cibles biologiques de l'action des cytotoxiques

3- **Les lysosomes**, ils inhibent les capacités de dégradation de la cellule.

4- Le **patrimoine génétique** peut-être altéré par les **généotoxiques**.

Mécanismes biochimiques impliqués dans la mort cellulaire

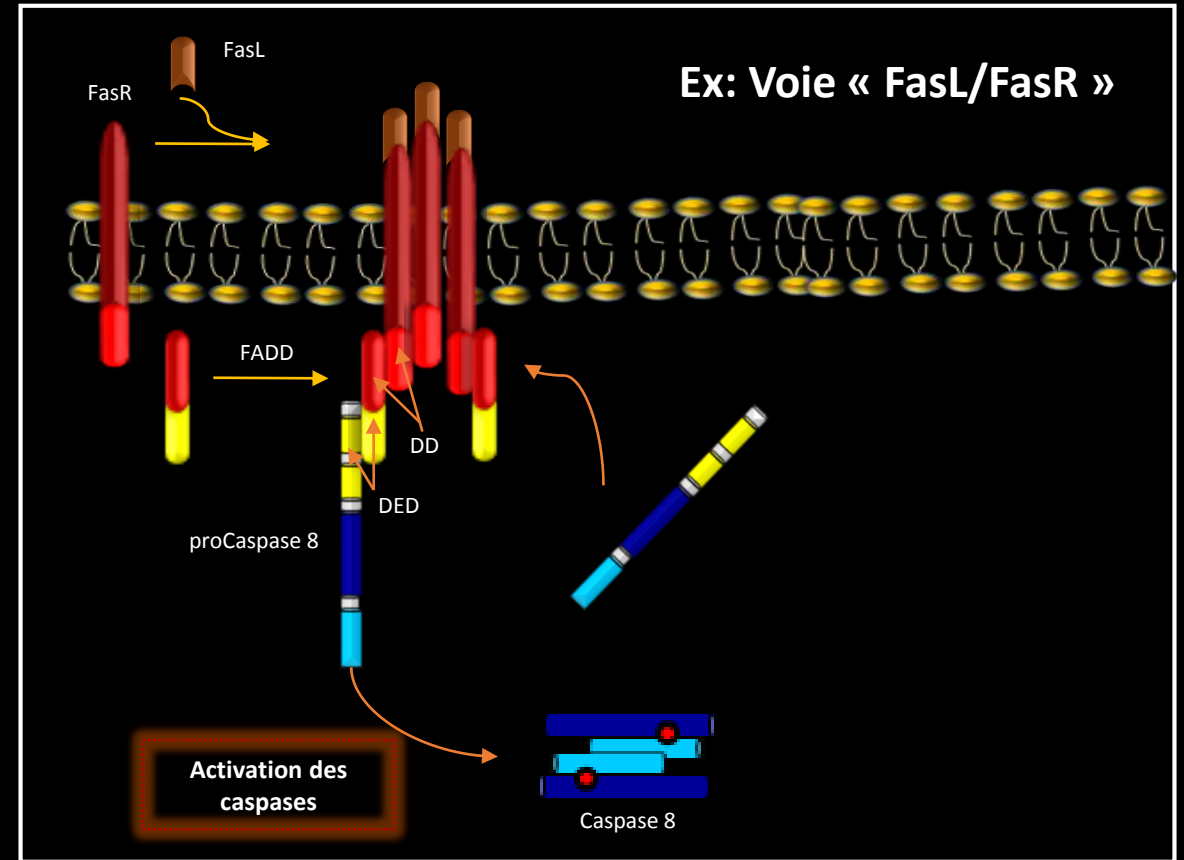
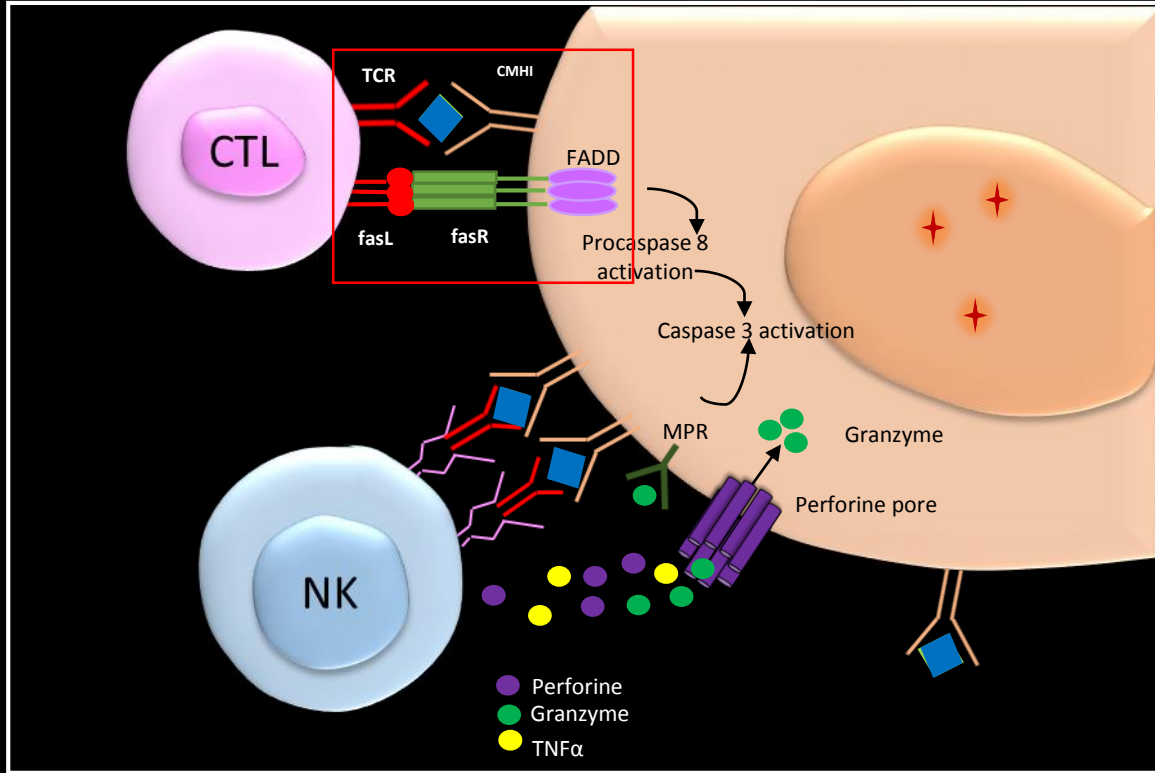
- L'élévation de la concentration cytosolique en Ca^{++} qui était maintenue grâce à un contrôle très strict du transport membranaire et par des réserves internes situées dans les mitochondries et le réticulum endoplasmique, une rupture de cette régulation est souvent le premier événement du développement de la toxicité cellulaire.
- La déplétion en ATP et/ou la diminution du rapport ATP/ADP sont des événements consécutifs à des atteintes mitochondriales directes ou indirectes, ils entraînent des troubles de l'anabolisme, un arrêt de la plupart des fonctions cellulaires essentielles.

Mécanismes biochimiques impliqués dans la mort cellulaire

- une élévation du Ca⁺⁺ intracellulaire par inhibition des ATPases contrôlant l'homéostasie calcique.
- Une altération de l'état d'oxydoréduction lié à l'effondrement du taux de glutathion réduit (GSH), ainsi que les activités enzymatiques de la superoxyde dismutase et la catalase qui déterminent le statut antioxydant des cellules.

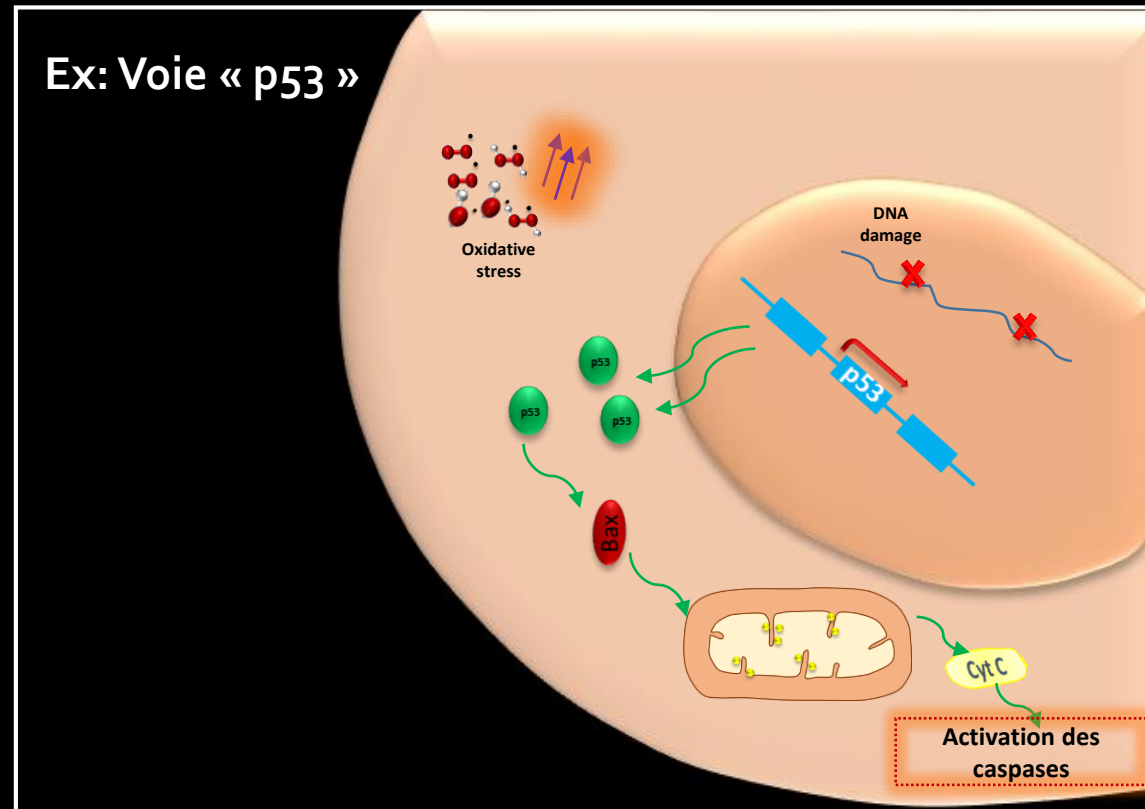
Exemple : Mort cellulaire programmée (Apoptose)

Signale Extrinsèque: Implication des récepteurs de Mort



Exemple : Mort cellulaire programmée (Apoptose)

Signale intrinsèque: Implication de mitochondrie



Exemple : Mort cellulaire programmée (Apoptose)

Tableau. Comparaison entre l'apoptose et la nécrose

	Nécrose	Apoptose
Facteurs inducteurs	Pathologiques	Physiologiques
Régulation	Non	Oui
Mode de survenue	Amas de cellules	Cellules isolées
Volume cellulaire	Augmenté	Diminué
Noyau	Dispersion de la chromatine	Condensation de la chromatine
Cytoplasme	Organites atteints	Organites intacts
Membrane cytoplasmique	Lésée	Intacte
Réaction inflammatoire	Présente	Absente

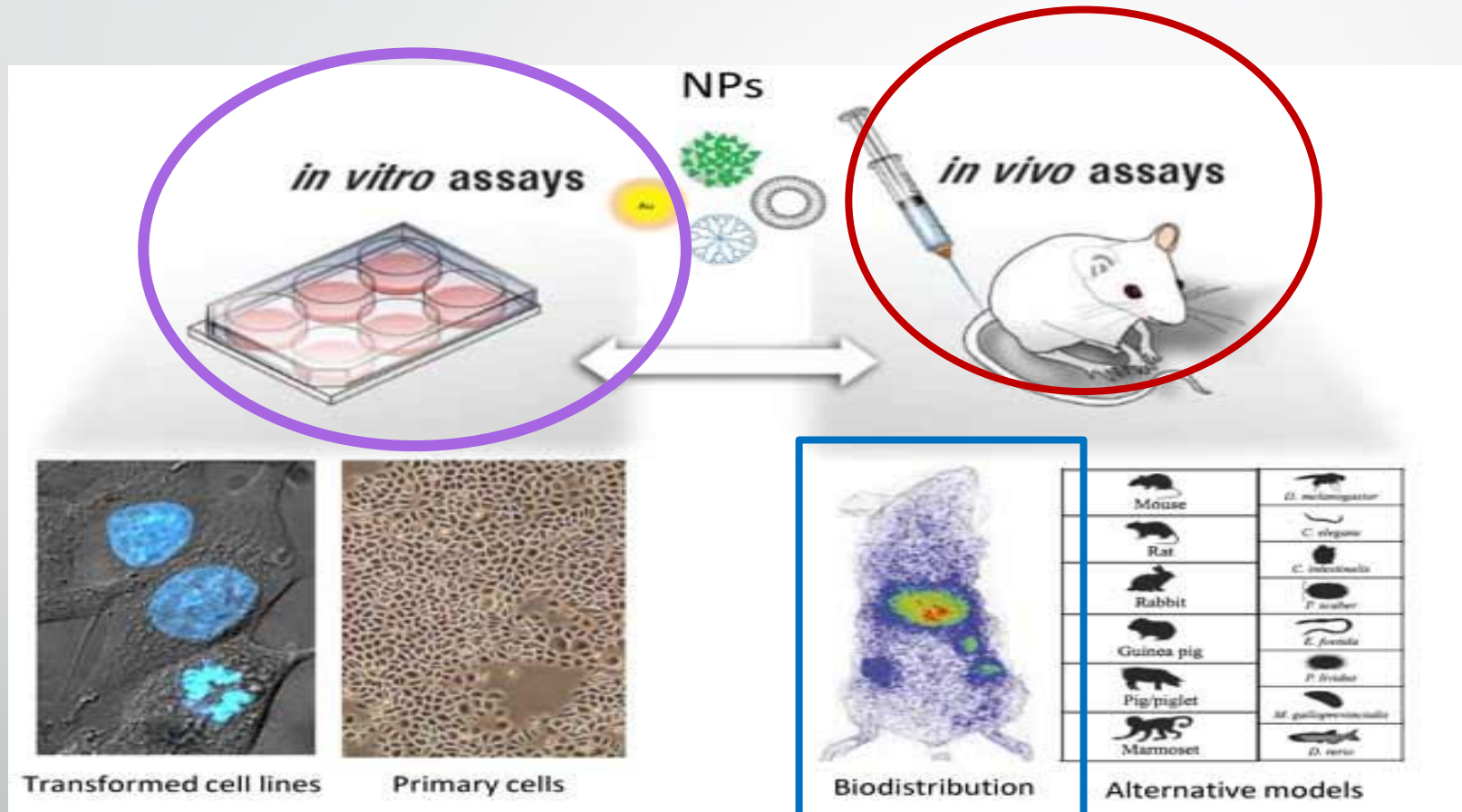
Tests de cytotoxicité (in-vitro)

1. Les tests effectués sur les animaux donnent des informations pathologiques mais ils sont soumis à des lois d'éthique.
2. Les tests in-vitro sont effectués dans un tube à essai en utilisant des cellules provenant d'un organe qui peuvent être utilisées pour évaluer l'effet cytotoxique des substances chimiques sur un type spécifique de cellules ou de tissus (culture cellulaire),
3. **Criblage** (screening) des substances chimiques afin de minimiser ou réduire les quantités consommées.
4. L'étude de l'effet des substances chimiques à l'échelle cellulaire (évaluation du stress oxydatif) et la détermination des voies cellulaires (Ex: les voies de signalisation).
5. Ne peut mimer les tests in-vivo.

Comparaisons des tests in-vivo et in-vitro (avantages et inconvénients)

Etude in-vivo	Tests in-vitro
Expérimentation animal Validation par les comités d'éthique animal	Disponibilité de cultures cellulaires spécifique (sale de culture), éthique n'est appliqué,
Nécessite un protocole d'expérimentation animale valide Un terrain d'élevage (animalerie) avec des normes internationales	Etude d'un type cellulaire spécifique Nécessite une lignée cellulaire (HeLa, HCT116, LoVo, MCF-7....etc),
Etude sur le développement, changement embryonnaire , demi de vie...etc.	Etude des mécanismes moléculaire
Etude la distribution dans les tissus et la pharmacocinétique de la substance	Tester une petite dose de la substance (Très important),

Comparaisons des tests in-vivo et in-vitro (avantages et inconvénients)



Bioconcentration
métabolisme
Biomarqueur de réponse

Les tests in-vivo ne peuvent pas être remplacés

1. Les médicaments ou les substances chimiques peuvent être métabolisés au sein de l'organisme .
2. étudier les effets chroniques ou faire de tests de longue durée,
3. étudier plusieurs organes (distribution).
4. étudier un système ou organe ex: ciblé ; le système respiratoire, ou le système reproductive,...etc .
5. Tester les différents mode d'entrer: peau, inhalation, absorption par l'intestin ,...etc.
6. La toxico-cinétique, Le processus d'élimination, la clairance et calcul de la demi de vie.

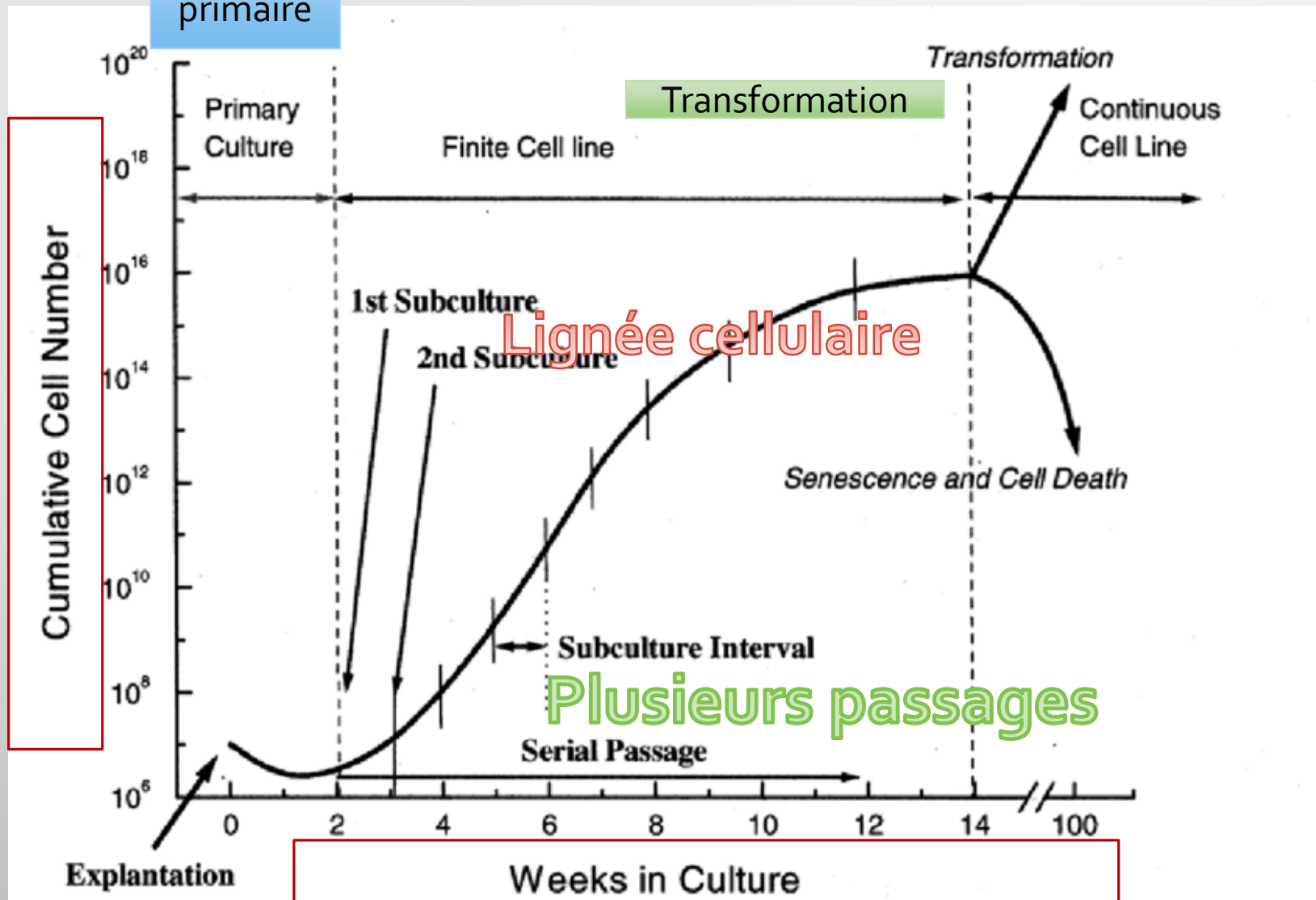
Tests de cytotoxicité (in-vitro)

- L'utilisation des cultures cellulaire dans la réalisation des études de la toxicité.
- Une large liste des substances chimiques et médicaments sont disponibles pour
- La culture cellulaire est la culture de cellules animales ou végétales dans un milieu nutritif extérieur à l'organisme.
- Certaines substances nouvelles
- Des réglementations des organisations de renommée dans le monde, spécialement dans l'union européenne.
- Exigeant que chaque nouvelle substance doit être examinée, en utilisant des tests in-vitro de haut débit en utilisant des cultures primaire ou des lignées cellulaire immortalisées.

Une culture primaire est une culture cellulaire non immortalisée obtenue directement à partir d'un tissu.

Une lignée cellulaire est issue d'une culture de cellules en division formées à partir de la division cellulaire (en pratique plus d'une) sélectionnée dans un organisme multicellulaire,

Culture
primaire



Evolution d'une lignée cellulaire

Evolution d'une lignée cellulaire (commentaire)

- Ce graph détermine les étapes de l'évolution d'une lignée cellulaire animal, l'axe des Y (ligne verticale) représente le nombre de cellule, l'axe des X (ligne horizontale) représente la durée de la culture.
- Dans **le jour zéro** le nombre de cellules est très bas , les cellules sont maintenues dans une culture primaire dans un milieu de culture jusqu'elles se transforment en lignée cellulaire, une fois transformée le nombre de cellules augmentent, d'ou on réalisent des sous culture avec plusieurs passages (pour garder les cellules vivantes) , Si non les cellules n'auront pas assez de milieu de culture et Après plusieurs passages la cellule rentre dans la senescence est meure (raccourcissement de télomères, vieillissement) seule les cellules transformées continuent a vivre et deviennent immortelle

Méthodes d'études de la cytotoxicité

Des méthodes fondées essentiellement sur des perturbations de la perméabilité membranaire:

- Méthodes de cytotoxicité utilisant des colorants
- Méthodes mesurant le relargage des molécules dans le milieu extra cellulaire:

Des méthodes fondées sur des altérations de la prolifération cellulaire:

- méthodes de numération: reflet du nombre de cellules
- méthodes biochimiques: qui quantifient l'ADN, les protéines totales,

Autres méthodes: Ils existent d'autres méthodes à principes différents, exemple : les méthodes morphologiques fondées sur l'étude des altérations cellulaires jusqu'à la lyse.

Les phases du test de cytotoxicité :

Un test se déroule classiquement en 3 phases :

- **Phase 1 'Equilibre'**: Après inoculation des cellules, on laisse une phase d'équilibre de manière à stabiliser la population avant l'introduction de la drogue.
- **Phase 2 'Exposition'**: On ajoute la drogue à tester. Souvent les premières expérimentations sont réalisées avec **une gamme** de cette substance de manière à établir **une courbe (dose – réponse)** afin **de vérifier le comportement des cellules.**
- **La durée de l'exposition** est variable en fonction de la drogue et/ou de ce que l'on souhaite mesurer :
 - → **contact bref** pour mettre en évidence **un effet nécrotique** immédiat,
 - → **contact long** (jusqu'à plusieurs jours) pour mettre en évidence **une inhibition de la prolifération.**
- **Phase 3 'Test'**: Des mesures de viabilité ou de cytotoxicité de cellules habituellement sont déterminées à la fin de la période d'exposition.
- Selon la procédure utilisée, les données peuvent être obtenues rapidement (mesure LDH ou d'ATP en quelques minutes) ou après plusieurs heures (MTS ou resazurine).

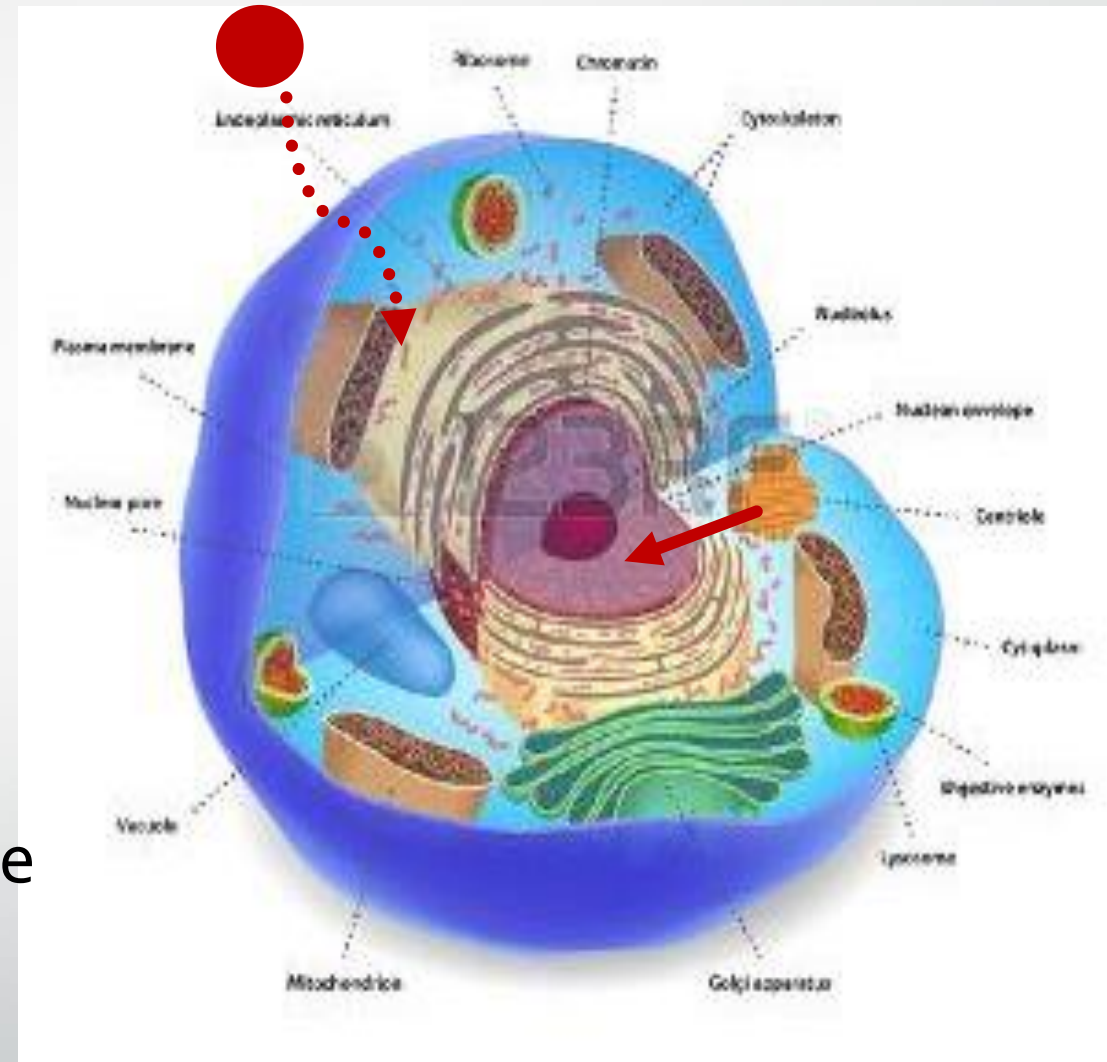
On établit ainsi in vitro la **LD 50** de la drogue testée.

Comment faire un teste de cytotoxicité

- **Etude mécanistique**
- **Evaluation de la cytotoxicité ou la viabilité**
- **“Les activités cellulaires” refléter par potentiel mitochondriales**

1. Etude mécanistique

- On doit déterminer si la substance chimique qu'on veut tester peut pénétrer dans la cellule ,
- Mode de Pénétration : Diffusion, Transport passif, active?
- Quelle est la dernière cible de la substance? Exe: Noyau
- La substance chimique peut précipiter en dehors la cellule dans le milieu de culture.

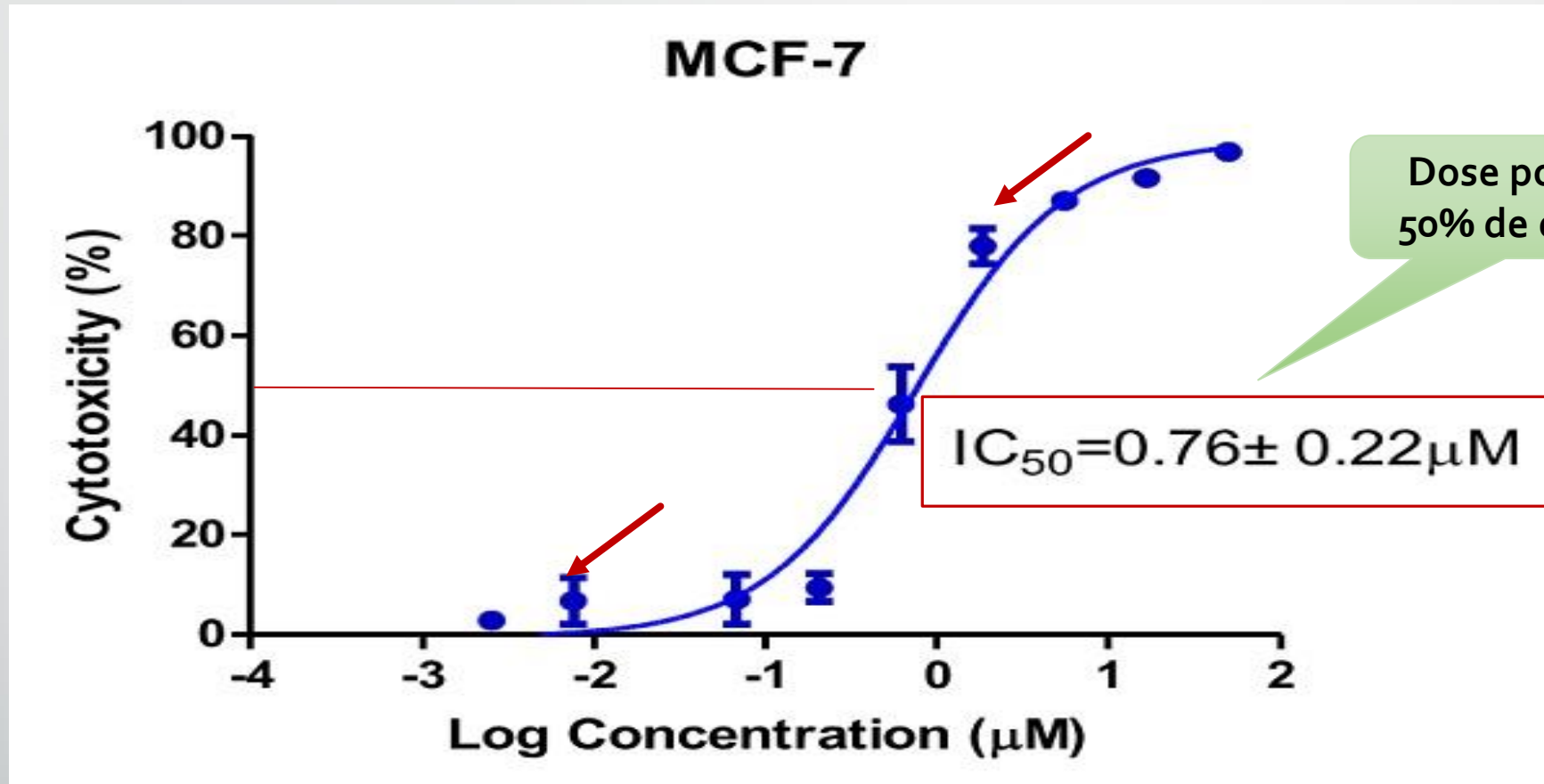


1. Etude mécanistique

Ces points devront être précisé dans un teste de cytotoxicité d'une nouvelle molécule

- 1. Comment la substance chimique traverse la membrane ?
- 2. Ou est ce qu'il va allé après sa pénétration et comment?
- 3. Comment il va agir sur sa cible cellulaire ?
- 4. Comment il va être éliminer de la cellule (détoxifier)? Calcule du taux de la clairance.
- 5. Comparer son effet sur différents types cellulaire
- 6. Transfection d'ADN dans les cellules , pour l'étude de l'expression ou la répression d'un gène d'intéret pour l'évaluation des effets biochimiques .
- 7. Comprendre les mécanismes d'actions par l'étude des biomarqueurs des effets toxiques (voie de signalisation, enzymes.....etc)
- **8. Quels dose devront nous choisir?**

2. Evaluation de la cytotoxicité ou la viabilité



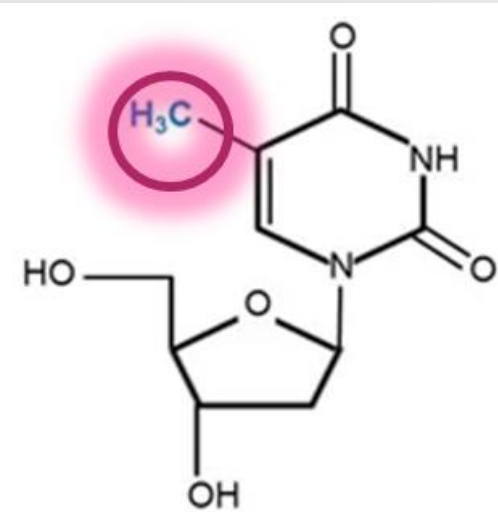
Test Dose-dependant

Temps

effet toxique aigue après 24h, 48h, 72h, 96h

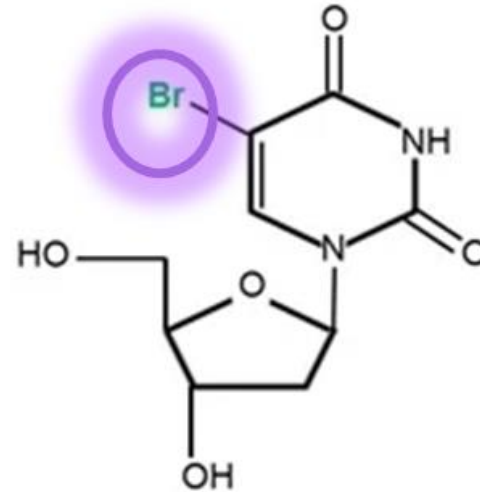
2. Evaluation de la cytotoxicité ou la viabilité

- Pr
- de
- Di
- (T
- M
- ble
- d'A



Thymidine

analogue



5'-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)

- Membrane: relargage de lactate déshydrogénase (LDH) des cellules morte (évaluation immédiate du taux du LDH). (tester l'intégrité membranaire).

déterminé le nombre
les marqués dans l'ADN
chondrie (MTT, Alamar
rifier la production

2. Evaluation de la cytotoxicité ou la viabilité

Tableau : principaux Tests de la cytotoxicité cellulaire

Technique	Bleu de Trypan	Rouge neutre	MTT	La résazurine
Paramètre mesuré	Viabilité	Viabilité	Capacité métabolique	Capacité métabolique
Principe	Colorant d'exclusion, seule les cellules mortes seront colorées	rouge neutre pour les cellules vivantes (colorant d'inclusion)	Métabolise le MTT du Formazan jaune insoluble en un précipité violet	Mesure la fluorescence, ou changement de couleur, il soit réduit de manière irréversible en résorufine, un indicateur coloré rose fortement fluorescent dans le rouge
Méthode de Lecture	Comptage cellulaire par hématimètre sous microscope	Lecture à une absorbance de 540 nm	Lecture à une absorbance de 540 nm	Lecture de fluorescence (excitation à 530 nm, émission à 590 nm) ou l'absorbance à 570 nm Ou 600 nm

Autre paramètres de cytotoxicité

- Etude des endommagement de l'ADN
- Organites, Cryométrie en flux
- Biomarqueurs
- Voie de signalisation (apoptose)
- Expression des gène (ARNm, protéine, activité enzymatique),
- Test des gènes rapporteur (transfection d'ADN)

Conclusions

- 1- Les tests de cytotoxicité sont complémentaire aux études in-vivo mais ne peuvent pas les remplacer,
- 2- L'utilisation des tests in-vitro est éthiquement acceptable,
- 3- permettent un criblage rapide d'un grand nombre de substances chimiques avec des doses minimales pour la détermination de LD₅₀,
- 4- Etude de l'effet des substances sur différents modèles cellulaires,
- 5- Obtention rapide des données et interprétation des résultats,
- 6- Etude du métabolisme et mécanisme moléculaire des médicaments.