

Les lignées cellulaires au secours des poissons

Des centaines de milliers de poissons meurent à l'échelle mondiale chaque année dans le cadre des tests de toxicité. L'Eawag tente de leur trouver une alternative et les cellules de poisson semblent constituer une piste intéressante. Il se trouve cependant que les produits chimiques ont généralement une action toxique plus faible sur les cellules de poisson que sur les poissons eux-mêmes. Cet article vous apprend pourquoi et vous montre comment les tests sur cellules de poisson peuvent être optimisés.

D'après une estimation [1], 54 millions de vertébrés seront utilisés pour la réalisation d'études toxicologiques dans les 10 prochaines années. Ceci notamment dans le cadre de la nouvelle réglementation chimique européenne REACH (enRegistrement, Evaluation et Autorisation des substances CHimiques) qui exige depuis juin 2007 une évaluation du risque pour l'environnement et la santé humaine de toutes les substances chimiques mises en circulation dans l'Union européenne en quantité supérieure à une tonne par an. Les poissons sont les animaux les plus fréquemment utilisés pour l'évaluation du risque environnemental des produits chimiques. Et la toxicité des substances testées est le plus souvent évaluée à partir des taux de mortalité qu'elles provoquent (essai n° 203 de l'OCDE pour la détermination de la toxicité aiguë chez les poissons). L'inconvénient de ces tests est non seulement de coûter la vie aux poissons exposés, mais aussi de ne livrer aucune information sur les mécanismes d'action des produits chimiques et de ne pas permettre la mise en évidence des effets chroniques. Dans le cadre du projet « CEllSens » (De-

Elaboration d'une lignée de cellules

Des lignées cellulaires peuvent être élaborées à partir d'organes et de tissus de diverses espèces de poissons. Les premières cellules obtenues se trouvent tout d'abord en culture primaire. Lorsque ces cultures primaires peuvent être multipliées, une lignée cellulaire peut être constituée. Les lignées de cellules de poisson ont un avantage décisif sur celles de mammifères comme la souris ou l'homme : la plupart d'entre elles sont des lignées immortalisées et permanentes, c'est-à-dire qu'elles peuvent être indéfiniment divisées et multipliées. Cette immortalisation se produit spontanément chez les cellules de poisson, pour des raisons non encore élucidées à ce jour.

L'utilisation d'animaux n'est nécessaire qu'au début du processus d'élaboration de la lignée cellulaire et elle se limite, dans l'idéal, à un seul animal. Une fois la lignée établie, les animaux n'interviennent plus.

velopment of a strategy to predict acute fish lethality using fish cell lines and fish embryos), l'Eawag tente de trouver de nouvelles solutions pour les tests de toxicité sur les poissons. En plus des modèles prévisionnels par simulation numérique et de l'exposition d'embryons de poisson zèbre, les cellules de poisson constituent une piste intéressante (cf. encadré).

Le problème: dans les tests, les cellules de poisson sont moins sensibles que les poissons eux-mêmes. Malgré leur potentiel prometteur, l'utilisation des cellules de poisson n'est pas encore établie dans les tests officiels. De nombreuses études font état d'une bonne corrélation entre la toxicité cellulaire et la toxicité aiguë au niveau du poisson entier. Ces observations se réfèrent à la sensibilité relative, c'est-à-dire au positionnement du produit testé sur une échelle allant de non toxique à très toxique. Si par contre on considère les valeurs dans l'absolu, les cellules s'avèrent environ dix fois moins sensibles que les poissons eux-mêmes [2]. Cela signifie que les tests cellulaires nécessitent des concentrations de produits chimiques plus élevées pour obtenir le même effet toxique. Cette différence de comportement entre poisson et cellule dans les tests serait notamment liée à la bio-

Culture des cellules de poisson en conditions stériles.



Katrin Tanneberger, chimiste spécialisée en Sciences des aliments, est post-doctorante au département de Toxicologie de l'environnement de l'Eawag.
Coautrices: Christina Otto, Kristin Schirmer

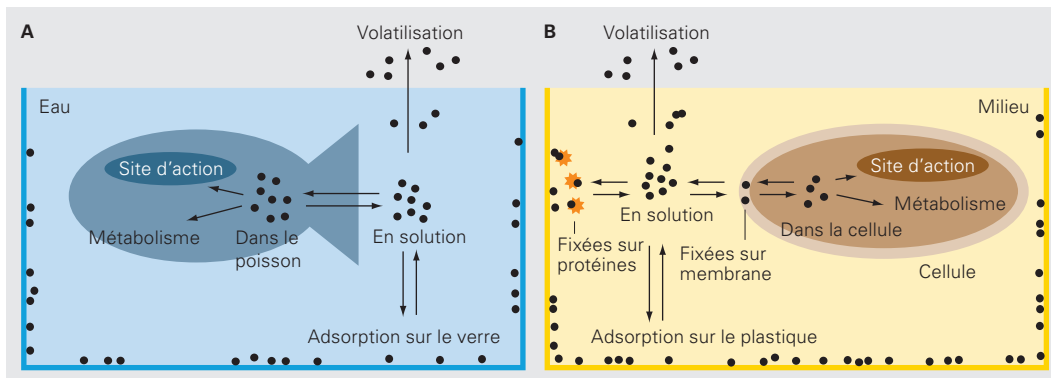


Fig. 1 : Dans les tests sur poissons (A) ou sur cellules (B), la diffusion des substances chimiques vers leur site d'action est influencée par plusieurs facteurs en concurrence les uns avec les autres qui déterminent la proportion de toxique pouvant pénétrer dans la cellule ou dans l'organisme et pouvant donc y causer des dommages. Dans notre cas, l'adsorption des substances sur les protéines peut être négligée car notre milieu d'exposition (L15/ex) n'en contient pas.

disponibilité des substances, c'est-à-dire à la quantité de toxique réellement accessible aux cellules [2]. En effet, bien que les voies de diffusion soient sensiblement les mêmes dans les poissons et dans leurs cellules (Fig. 1), les cultures cellulaires usuelles en plaques de microtitration favorisent les pertes par le biais, par exemple, d'une adsorption des substances sur les parois des puits. Ainsi, le rapport entre la surface susceptible de causer une sorption et le volume du récipient de laboratoire est beaucoup plus élevé pour une plaque que pour un aquarium: un aquarium de dix litres de $20 \times 20 \times 25$ cm présente un rapport surface sur volume de $280 \text{ cm}^2/\text{l}$ alors que ce rapport est de $10\,000 \text{ cm}^2/\text{l}$ pour une plaque 24 puits de 1,6 cm de diamètre et de 1,7 cm de hauteur.

Nous recherchons actuellement des solutions pour optimiser les tests en intervenant en particulier sur les propriétés physico-chimiques des substances, sur le milieu d'exposition et sur la méthode d'application du toxique potentiel (Fig. 1). Dans le projet CEllSens, nous travaillons ainsi avec 60 substances organiques représentatives se distinguant par leurs modes d'action toxique, leurs propriétés physicochimiques (volatilité et lipophilie par ex.) et leur toxicité (de faible à forte) [3].

L'ampleur des phénomènes de sorption et de volatilisation dépend des propriétés physicochimiques des substances.

Les processus tels que la sorption ou la volatilisation dépendent des propriétés physicochimiques des produits chimiques. Plus la substance testée est lipophile, plus elle aura tendance à se lier aussi bien aux parois des récipients, surtout s'ils sont en plastique, qu'aux protéines contenues dans le milieu de culture. La volatilité d'une substance est quant à elle décrite par la constante de Henry. Plus celle-ci est grande, plus le produit est volatil. Les deux facteurs de lipophilie et de volatilité réduisent donc la bio-disponibilité des substances chimiques et induisent de ce fait une baisse de sensibilité des tests.

Jusqu'à présent, ces propriétés physicochimiques ont été rarement prises en compte dans les études *in vitro*. Il est cependant assez aisé de le faire en déterminant la concentration de composé non lié dans le milieu. A l'aide d'un modèle mathématique, nous avons pu montrer que la sensibilité absolue du test sur cellules augmentait fortement quand les valeurs de toxicité mesurées étaient corrigées d'un facteur tenant compte de la lipophilie et de la volatilité des substances testées [4]. La sensibilité

absolue obtenue après correction était alors similaire chez les cellules et les poissons.

Quand il vaut mieux en faire moins: notre expérience du milieu minimal. Beaucoup d'ingrédients entrant dans la composition d'un milieu de culture comme le sérum, les vitamines ou les antioxydants ont un effet protecteur sur les cellules. Contrairement aux lignées de cellules humaines, celles de poisson utilisées à l'Eawag sont capables de subsister dans un milieu minimal développé par nos soins qui ne renferme que des sels minéraux, du galactose et du pyruvate [5]. Maintenant commercialisé, ce milieu de culture appelé L15/ex a été développé à partir du milieu L15 autrefois utilisé. Un effet sensibilisateur de L15/ex sur les cellules de poisson a déjà pu être observé [6].

Application directe vs indirecte. Dans une autre étude, nous avons pu démontrer que la toxicité des substances chimiques dépendait également de la méthode d'application employée, notamment lorsque le DMSO (diméthylsulfoxyde) était utilisé comme solvant [7]. Le rajout de quantités définies de substance à tester dans le milieu peut se faire de façon directe ou indirecte. Lors de l'application directe, des quantités définies de solution mère hyper-concentrée sont simplement appliquées à la pipette sur les cellules dans le milieu d'exposition. A l'inverse, l'application indirecte se base sur l'exposition des cellules à une solution diluée de produit chimique préalablement préparée avec du L15/ex (Fig. 2A). A priori, le choix de la méthode d'application ne devrait pas avoir d'incidence sur la toxicité de la substance appliquée. Or l'expérience prouve le contraire. Nous avons testé les deux méthodes avec le 1,2-dichlorobenzène (DCB) et constaté un décalage vers la droite de la courbe dose-réponse pour l'application indirecte. Ainsi, la CE_{50} (concentration causant la mort de 50 % des cellules exposées) obtenue avec l'application directe était cinq fois plus faible qu'avec la seconde méthode (Fig. 2B). Pour découvrir les raisons de cette différence, nous sommes allées explorer l'intérieur des cellules.

Que nous apprennent les concentrations internes? Le DMSO possède des propriétés perméabilisantes, c'est-à-dire qu'il accroît la perméabilité des membranes cellulaires et facilite ainsi la pénétration des substances chimiques testées. Contrairement

à l'application indirecte où les cellules sont exposées à une solution homogène de L15/ex, de DMSO et de DCB, l'application directe provoque la formation à la surface des cellules d'un film de DMSO et de DCB. Se pourrait-il que la formation de ce film facilite l'absorption du toxique par les cellules ? Pour vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré la concentration intracellulaire de DCB immédiatement après l'application de la solution chimique. En effet, la toxicité d'une substance est due non pas à sa concentration à l'extérieur, mais bien à l'intérieur des cellules cibles. Nos dosages montrent qu'effectivement la quantité de DCB absorbée par les cellules est beaucoup plus importante après une application directe qu'après une application indirecte.

L'écotoxicologie fait d'autre part appel au concept de charge corporelle mortelle (« lethal body burden ») qui décrit la concentration totale qu'une substance chimique doit atteindre dans l'organisme pour avoir un effet léthal. Cette concentration est exprimée en mmol/kg de poids frais. McCarty et ses collaborateurs [8] ont calculé que la charge corporelle mortelle des substances ayant un mode d'action narcotique comme le DCB était comprise entre 2 et 8 mmol/kg chez le poisson. Nous avons repris ce concept pour les cellules de poisson et avons obtenu pour notre lignée RTgill-W1 des valeurs de 6 mmol DCB par kg de poids frais pour l'application directe et de 4 mmol DCB/kg pour l'application indirecte. Si on considère donc la concentration létale intracellulaire, la différence de sensibilité entre application directe et indirecte s'estompe et les effets toxiques mesurés restent valables quelle que soit la méthode d'application employée.

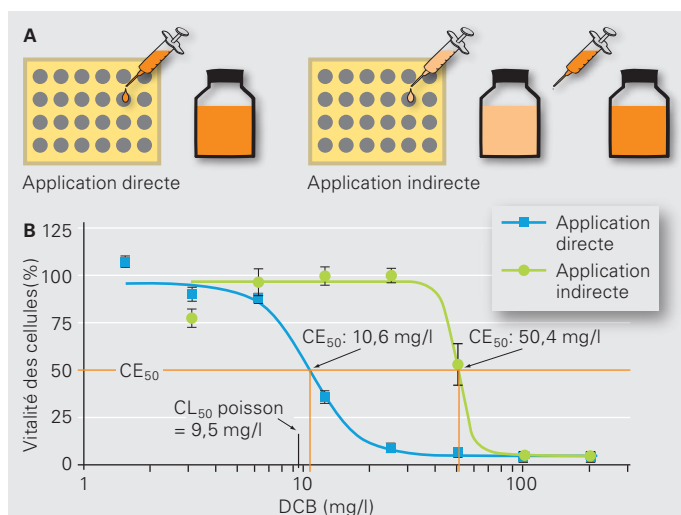
Néanmoins, bien qu'une application directe permette déjà d'obtenir une sensibilité comparable entre poissons et cellules de poisson sans avoir à déterminer les concentrations intra et extracellulaire en toxique, nous préconisons une application indirecte de la substance à tester sur les cellules. En effet, la méthode indirecte correspond mieux aux conditions naturelles d'exposition

des poissons dans le milieu aquatique et livre donc le scénario le plus plausible. D'autre part, elle permet d'éviter que certaines cellules ne soient exposées à des concentrations beaucoup plus élevées que d'autres. Pour rendre correctement compte de la sensibilité des cellules de poisson, la toxicité devra cependant toujours se rapporter à la concentration intracellulaire effective.

Les cellules de poisson sont une bonne alternative pour les tests de toxicité. Moyennant une optimisation des conditions expérimentales, les cellules de poisson constituent donc un matériel prometteur pour la réalisation de tests de toxicité dans le cadre d'une évaluation des substances chimiques, et notamment de la mise en œuvre de la réglementation chimique européenne REACH. Le projet CEIIISens se préoccupe d'autre part de la définition de nouveaux effets à observer. En effet, la mortalité n'est qu'un des effets mesurables possibles et ne compte pas parmi les plus sensibles. De plus, elle ne livre aucune information sur les modes d'action du toxique. Nous sommes donc actuellement à la recherche de gènes marqueurs appropriés, dont les profils d'expression permettraient de comprendre pourquoi telle ou telle substance chimique est toxique pour les cellules. Les nouveaux tests de toxicité basés sur les cellules de poisson permettraient donc non seulement de réduire le nombre d'expérimentations animales mais aussi d'analyser dans le détail les modes d'action toxique et les effets chroniques des substances chimiques. ○○○

Débuté en décembre 2006, le projet « CEIIISens » est financé par le Conseil européen de l'industrie chimique (Cefic) et le « Department for Environment Food and Rural Affairs – Defra U.K. ».

Fig. 2: (A) Représentation schématique des méthodes d'application directe et indirecte. (B) La position de la courbe dose-réponse et donc la valeur de la CE₅₀ du 1,2-dichlorobenzène (DCB) sont influencées par le mode d'application de la substance.



- [1] Hartung T., Rovida C. (2009): Chemical regulators have overreached. *Nature* 460, 1080–1081.
- [2] Schirmer K. (2006): Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish. *Toxicology* 224, 163–183.
- [3] Schirmer K., Tanneberger K., Kramer N.I., Völker D., Scholz S., Hafner C., Lee L.E.J., Bols N.C., Hermens J.L.M. (2008): Developing a list of reference chemicals for testing alternatives to whole fish toxicity tests. *Aquatic Toxicology* 90, 128–137.
- [4] Kramer N.I., Hermens J.L.M., Schirmer K. (2009): The influence of modes of action and physico-chemical properties of chemicals on the correlation between *in vitro* and acute fish toxicity data. *Toxicology in Vitro* 23, 1372–1379.
- [5] Schirmer K., Chan A.G.J., Greenberg B.M., Dixon D.G., Bols N.C. (1997): Methodology for demonstrating and measuring the photocytotoxicity of fluoranthene to fish cells in culture. *Toxicology in Vitro* 11, 107–119.
- [6] Dayeh V.R., Lynn V.H., Bols N.C. (2005): Cytotoxicity of metals common in mining effluent to rainbow trout cell lines and to the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila*. *Toxicology in Vitro* 19, 399–410.
- [7] Tanneberger K., Rico Rico A., Kramer N.I., Buser F.J.M., Hermens J.L.M., Schirmer K. (eingereicht): Effects of solvents and dosing procedure on chemical toxicity in cell-based *in vitro* assays.
- [8] McCarty L.S., Mackay D., Smith A.D., Ozburn G.W., Dixon D.G. (1991): Interpreting aquatic toxicity QSARs: the significance of toxicant body residues at the pharmacological endpoint. *The Science of the Total Environment* 109–110, 515–525.