

ARTICLE

Évaluation de l'immunotoxicité en recherche et dans le cadre du développement biomédical

Cathy Nguyen¹ et Lars Petter Jordheim^{2,*}

¹ Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, ISPB, F-69008 Lyon, France

² Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, ISPB, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69008 Lyon, France

Reçu le 21 octobre 2022

Résumé – L'immunotoxicologie est l'étude des effets toxiques de toute substance sur le système immunitaire et ses fonctions. Dans les différents domaines d'application, cette science est cadrée par divers textes réglementaires et lignes directrices. Les études sont basées sur des techniques *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* et sont observationnelles ou fonctionnelles, permettant respectivement de démontrer un effet et de décrire les mécanismes en jeu. Dans cette revue, nous présentons les différents tests à effectuer dans le domaine biomédical, avec une attention particulière au test d'évaluation de la réponse thymo-dépendante (TDAR). Nous discutons également brièvement des évolutions à suivre dans ce domaine cherchant entre autres une approche plus éthique comme la limitation de l'utilisation des animaux de laboratoire. Ces évolutions sont notamment représentées par le développement de modèles cellulaires pertinents.

Mots clés : immunotoxicité, immunosuppression, hypersensibilité, auto-immunité, études précliniques

Abstract - Evaluation of immunotoxicity in biomedical research and development. Immunotoxicology aims at studying toxic effects of any substance on the immune system and its functions. In its various fields of application, this science is dependent on regulatory texts and guidelines. Studies are based on *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* techniques and are observational or functional allowing the identification of a toxic effect and its underlying mechanisms, respectively. Here, we review the various tests to perform in biomedical research and development, with a particular interest for the T-cell Dependent Antibody Response (TDAR) assay. We also briefly discuss the upcoming evolutions in this domain within a more ethically sound framework such as limiting the use of laboratory animals. These evolutions are represented by the development of relevant cell models.

Keywords: immunotoxicity, immunosuppression, hypersensitivity, auto-immunity, preclinical studies

Abréviations

ADA *Anti-Drug Antibodies*
BALT *Bronchus-Associated Lymphoid Tissues*
CMH Complexe Majeur d'Histocompatibilité
ELISA *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*
EMA *European Medicines Agency* (Agence Européenne du Médicament)
FDA *Food and Drug Administration*
ICH *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (Conseil International

d'Harmonisation des Exigences Techniques pour l'Enregistrement des Médicaments à Usage Humain)
KLH *Keyhole Limpet Hemocyanin*
LLNA *Local Lymph Node Assay*
LLNP *Local Lymph Node Proliferation*
LPS Lipopolysaccharide
NALT *Nasal-Associated Lymphoid Tissues*
NHP Primate non humain
NOAE *No Observed Adverse Effect Level*
OCDE Organisation de Coopération et de Développement Économiques
OPPTS *Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances*
PBMC Cellules mononuclées du sang périphérique
PFC *Plaque-Forming Cell Assay*

*Auteur correspondant :

lars-petter.jordheim@univ-lyon1.fr

REACH	<i>Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals</i>
SRBC	Erythrocytes de mouton (<i>Sheep Red Blood Cells</i>)
TDAR	<i>T-cell Dependent Antibody Response</i>
TIAR	<i>T-cell Independent Antibody Response</i>
TT	<i>Tetanus toxoid</i> (anatoxine tétanique)
US EPA	<i>US Environmental Protection Agency</i> (Agence de Protection de l'Environnement des États-Unis)

Introduction

L'immunotoxicologie est l'étude du dysfonctionnement du système immunitaire induit par l'exposition à un xénobiotique chimique ou biologique. L'immunotoxicité peut se manifester par une immunosuppression, une immunostimulation, une allergie ou une réaction auto-immune (Tableau 1) (Peyton Myers, 2018). C'est une branche relativement récente de l'évaluation toxicologique des xénobiotiques qui s'applique à divers produits qui peuvent impacter la santé humaine et animale : pharmaceutiques (médicaments, cosmétiques), agro-alimentaires (pesticides, additifs alimentaires), chimiques, environnementaux (métaux lourds, particules), professionnels (hydrocarbures aromatiques polycycliques), entre autres (Anderson & Shane, 2018). Alors que des cas d'allergie et d'hypersensibilité à un produit étaient déjà documentés, notamment pour les pathologies respiratoires (Descotes, 2012), les cas d'immunosuppression sont signalés depuis les années 1970 et c'est en 1977 qu'est publiée la première revue d'immunotoxicologie (Vos & Moore, 1977). À la suite de l'émergence des médicaments immunomodulateurs, le domaine de l'immunotoxicologie est apparu en 1983. Ces immunomodulateurs peuvent altérer le fonctionnement du système immunitaire et sont notamment utilisés dans la transplantation d'organe, la chimiothérapie et le traitement de maladies auto-immunes (Luster, 2014). Par ailleurs, de nombreux nouveaux traitements utilisent des molécules issues des biotechnologies comme les anticorps monoclonaux, les protéines recombinantes (cytokines, hormones, facteurs de croissance) ou les protéines de substitution (facteurs de coagulation, enzymes). En raison de leur taille plus importante que celle des molécules conventionnelles et du degré d'humanisation des anticorps, ces protéines peuvent présenter une immunogénicité et générer des anticorps dirigés contre ces médicaments, les ADA (*Anti-Drug Antibodies*). Ces ADA peuvent notamment diminuer l'efficacité du traitement ou mettre en danger le patient par une réponse auto-immune (Meunier *et al.*, 2020).

Bien que les méthodes analytiques en immunologie soient déjà développées et utilisées communément dans les laboratoires, dans les premiers temps de l'immunotoxicologie, l'absence de standardisation des plans d'étude expérimentaux rendait délicate la comparaison des résultats entre les différents laboratoires (Germolec *et al.*, 2017). Des lignes directrices ont été mises en place

à partir de 1996 afin de répondre à cette problématique et aux exigences réglementaires (Hartung & Corsini, 2013) découlant des référentiels de l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE) (Dean *et al.*, 1998 ; Boverhof *et al.*, 2014). L'OCDE propose des lignes directrices généralistes permettant de détecter des effets immunotoxiques de produits chimiques, comme par exemple OCDE 407 pour le rat (OECD, 2008) et OCDE 409 pour les non rongeurs (OECD, 1998), qui ont été publiées en 1981. En 1995, elles ont été revues afin d'ajouter la mention de l'immunotoxicité. Les premières lignes directrices spécifiques concernaient les tests *in vivo* sur les rongeurs pour les pesticides, publiées par l'Agence de Protection de l'Environnement des États-Unis (*US Environmental Protection Agency*, US EPA) en 1996 avec les lignes directrices OPPTS 880.3550 (US EPA, 1996a) et OPPTS 870.7800 (US EPA, 1996c) pour évaluer l'immunotoxicité et OPPTS 880.3800 (US EPA, 1996b) pour évaluer la réponse immunitaire. L'OCDE a ensuite proposé en 2018 des lignes directrices plus spécifiques, avec OCDE 443 concernant les études de reprotoxicité (OECD, 2018) et OCDE 406 « Sensibilisation de la peau » (OECD, 2022). Pour les médicaments à usage humain, la ligne directrice S8 (EMA, 2018b) a été rédigée par le Conseil International d'Harmonisation des Exigences Techniques pour l'Enregistrement des Médicaments à Usage Humain (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*, ICH). Les produits biotechnologiques ont leur procédure spécifique dans la ligne directrice S6 de l'ICH (EMA, 2018a). Ces lignes directrices sont reprises notamment par les agences de santé européenne (Agence Européenne du Médicament ou *European Medicines Agency*, EMA) et américaine (*Food and Drug Administration*, FDA), mais l'évaluation des effets allergisants ou auto-immuns n'y est pas décrite. Concernant les produits chimiques, le règlement REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*) ne demande pas de réaliser des tests d'immunotoxicité en première intention. Cependant, le règlement REACH impose d'effectuer des études à doses répétées pour les essais d'immunotoxicologie à court (28 jours) ou à long terme (90 jours) (The European Commission, 2018).

Essais d'immunotoxicité pour les médicaments à usage humain

Pour l'évaluation de l'immunotoxicité d'un nouveau médicament à usage humain, les laboratoires suivent depuis le 1^{er} mai 2006 la ligne directrice S8 établie par l'ICH. Celle-ci a pour but de permettre la détection d'un potentiel effet immunotoxique basée sur une évaluation à niveaux de preuves, puis l'exploration et l'affirmation de cet effet par des essais pertinents le cas échéant (EMA, 2018b). Tous les nouveaux médicaments à usage humain doivent être évalués pour leur immunotoxicité en plus des études de toxicologie générale. Il est recommandé d'estimer cette immunotoxicité avant la phase III (développement clinique) pour une nouvelle molécule.

Tableau 1. Principales conséquences cliniques liées à un mécanisme d'immunotoxicité (d'après Descotes, 2009).

Altération immunitaire	Conséquences cliniques
Immunosuppression	Augmentation de l'incidence des infections (bactériennes, virales ou fongiques), de leurs complications et des rechutes, augmentation de l'incidence des tumeurs.
Immunostimulation	Syndrome du relargage de cytokines, augmentation de l'incidence des maladies auto-immunes et des réactions d'hypersensibilité non liées à un allergène, inhibition des voies de signalisation liées aux cytochromes P450.
Allergie	Réactions d'hypersensibilité (immunogénicité quand l'origine est liée aux anticorps) pouvant aller jusqu'au choc anaphylactique contre le produit.
Auto-immunité	Augmentation de l'incidence de pathologies auto-immunes systémiques ou spécifiques à un organe.

Cette évaluation du potentiel immunotoxique d'un médicament à usage humain se fait par une approche à deux paliers (Dean *et al.*, 1979, Dean, 2004 ; De Jong & Van Loveren, 2007 ; Plunkett *et al.*, 2010) :

- Le premier palier doit permettre la détection d'un effet potentiellement immunotoxique de la molécule en utilisant des tests observationnels cliniques et biologiques souvent inclus dans le développement préclinique et clinique du médicament (Tableau 2).
- Le second palier est effectué si un effet immunotoxique est détecté, d'abord pour le confirmer puis pour l'explorer afin de décrire le mécanisme lié à l'immunotoxicité, notamment par des tests fonctionnels.

Pour le premier palier, les paramètres ou marqueurs peuvent être (i) identifiés lors d'études de toxicologie générale, sur la base des propriétés pharmacologiques, pharmacocinétiques et physicochimiques du principe actif, et (ii) associés à une population ciblée particulière (immunodéprimés) ou à des conditions d'administrations particulières ou encore d'après des données cliniques (Tableau 2). En plus de la présence ou non de ces marqueurs, il est également important de prendre en compte la significativité statistique des résultats, la sévérité des effets, les doses et durées d'exposition pour lesquelles il y a eu un effet, le nombre d'espèces atteintes, la réversibilité des effets, les facteurs de stress associés à l'étude, ainsi que les cellules atteintes et le mécanisme de l'effet toxique observé. L'évaluation de ces marqueurs d'immunotoxicité permet la mise en place ou non d'une étude proprement dite de l'immunotoxicité de la molécule. La présence d'un seul marqueur d'intensité suffisante peut justifier les études d'immunotoxicité. Si cette évaluation n'est pas réalisée, elle doit être justifiée par l'entreprise qui développe la molécule.

Le plan d'étude d'évaluation de l'immunotoxicité doit, selon la ligne directrice ICH S8, prendre en compte les doses, la durée d'exposition, la voie d'administration et l'espèce utilisée.

Le choix de l'espèce repose sur la capacité de la molécule à être pharmacologiquement active chez l'animal. Ce choix est donc basé sur le degré d'homologie de la cible (récepteur, épitope) entre l'animal et l'homme, l'affinité de liaison, les similitudes pharmacocinétiques et les données obtenues lors d'études précliniques de toxicologie générale. Les espèces utilisées dans les études d'immunotoxicologie sont les rongeurs (souris, rat), le lapin, le miniporc, le chien et les primates non humains (singes cynomolgus et rhésus) (Kuper *et al.*, 2016). La souris est souvent utilisée pour réaliser des études d'immunologie fondamentale car son génotype et sa réponse immunitaire générale sont connus (Koller, 2001 ; Corsini & Loveren, 2014). Les primates non humains sont de plus en plus inclus dans les études avec l'avènement des biotechnologies (protéines recombinantes ou de substitution, anticorps monoclonaux). Par exemple, le choix du singe cynomolgus (*Macaca fascicularis*) dont la génétique et la physiologie sont proches de celles de l'Homme, notamment en immunologie, en endocrinologie et en neurologie, permet de mieux prédire les risques toxicologiques chez l'Homme. Il est par ailleurs recommandé d'évaluer l'immunotoxicité chez les deux sexes (Boisseau & Perrot, 2012 ; Kawabata & Evans, 2012).

La dose sélectionnée doit être suffisamment élevée et supérieure à la NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*), tout en évitant de générer une toxicité systémique liée par exemple au stress (EMA, 2018b). Il est recommandé d'évaluer plusieurs doses sur un schéma répété afin de déterminer l'existence ou non d'un effet-dose ainsi que la dose pharmacologiquement active la plus élevée sans effets immunologiques. Concernant la voie d'administration, il est recommandé d'utiliser la même que celle qui sera utilisée chez l'Homme.

La durée d'exposition à la molécule à tester doit être suffisamment longue pour suivre la cinétique des marqueurs de modifications du système immunitaire. Pour

Tableau 2. Principaux marqueurs d'immunotoxicité en toxicologie générale selon le facteur de risque étudié (d'après EMA, 2018b).

Facteurs de risque	Marqueurs d'immunotoxicité en toxicologie générale			
Études de toxicologie générale	Variation de la formule sanguine au niveau des globules blancs chez l'Homme :			
		Cellules	Diminution	Augmentation
	Hématologie	Leucocytes	Leucopénie (< 4 G/L)	Hyper-leucocytose (> 10 G/L)
		Polynucléaires neutrophiles	Granulopénie (< 1,5 G/L)	Granulocytose (> 7,5 G/L)
		Lymphocytes	Lymphopénie (< 1,5 G/L)	Lymphocytose (> 4 G/L)
	Anatomo-pathologie	Variation de poids ou d'aspect histologique des organes lymphoïdes (thymus, rate, ganglions lymphatiques, moelle osseuse)		
	Biochimie	Variation de concentration des protéines sériques (globulines) sans cause hépatique ou rénale		
	Infectiologie	Augmentation de l'incidence des infections		
Cancérologie	Augmentation de l'incidence des tumeurs sans origine génotoxique connue			
Population ciblée	Patients susceptibles d'être immunodéprimés de par leur pathologie ou un traitement immunosuppresseur			
Pharmacologie, pharmacocinétique et physicochimie	<ul style="list-style-type: none"> - Structure moléculaire du principe actif proche de celle d'une molécule connue pour ses propriétés immunotoxiques - Propriétés pharmacologiques du principe actif mettant en évidence une modulation du système immunitaire - Propriétés pharmacocinétiques (métabolisation, élimination) mettant en évidence une accumulation du principe actif dans les tissus ou cellules immunitaires 			
Données cliniques	Cas d'immunotoxicité trouvés durant les essais cliniques ou après sa commercialisation			

une étude s'intéressant à la réponse humorale en utilisant le test TDAR (voir plus loin), ces marqueurs sont les immunoglobulines M (IgM) et G (IgG). Afin de couvrir la demi-vie de ces immunoglobulines, il est nécessaire de réaliser une étude ayant une durée de 21 à 30 jours (28 jours en moyenne). Certaines études peuvent être de plus longue durée (90 jours) : c'est le cas pour l'évaluation des vaccins qui prennent aussi en compte le phénomène de mémoire immunitaire avec les stratégies de rappels vaccinaux.

Techniques d'évaluation du mécanisme de l'immunotoxicité

L'évaluation de l'immunotoxicité peut être réalisée *in vivo* (directement dans l'organisme vivant), *in vitro* (sur des cultures primaires ou des lignées cellulaires, la molécule testée étant ajoutée lors de la culture) ou *ex vivo* (les animaux sont traités puis les tissus ou les cellules sont prélevés pour être directement analysés ou cultivés *in vitro*). Les tests sont observationnels ou fonctionnels.

La préoccupation du bien-être animal a eu comme conséquence la mise en place de la règle des 3R (réduire, remplacer, raffiner). De ce fait, les tests *in vitro* constituent une approche éthiquement mieux acceptée grâce à l'utilisation de cellules, de lignées cellulaires ou de composants cellulaires, de préférence issus de l'Homme. Cependant, il est nécessaire de bien caractériser les populations cellulaires car cette technique n'est pas toujours représentative des mécanismes en jeu dans un organisme entier (Karmaus & Karmaus, 2018). Par ailleurs, il n'est pas encore possible de reproduire correctement l'ensemble du processus de l'immunisation *in vitro* avec la totalité des partenaires cellulaires. C'est pourquoi les modèles animaux sont encore utiles et utilisés pour étudier ce processus de manière plus pertinente.

Selon la ligne directrice ICH S8, chaque test utilisé doit être validé par le laboratoire qui l'emploie pour répondre à des exigences qualité. Les critères de validation à démontrer sont au minimum la précision intra- et inter-essais, la détermination des limites de quantification et la stabilité des échantillons. Il est aussi recommandé de bien caractériser le contrôle positif, élément essentiel lors des analyses permettant de valider les résultats, et de travailler dans un environnement respectant les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

Les tests observationnels en immunotoxicologie

Les tests observationnels permettent d'identifier les variations biologiques ou cliniques suggérant des effets immunotoxiques. Ils utilisent notamment des techniques de toxicologie générale comme l'anatomopathologie, le dosage des cytokines dans le sérum ou le plasma, le dosage des immunoglobulines sériques et l'immunophénotypage.

L'anatomopathologie apprécie dans un premier temps sur le plan macroscopique la modification de la forme, la taille ou l'aspect des organes ou des tissus lymphoïdes comme le thymus, la rate et les ganglions lymphatiques drainant la zone d'administration du médicament (Boisseau & Perrot, 2012). Lors des mesures, l'âge, le sexe, l'origine de l'élevage, l'état nutritionnel, les variations hormonales, le stress ou encore la présence d'infections ou de tumeurs sont notés. En effet, des variabilités inter-individuelles et intra-individuelles peuvent exister pour cette approche et doivent être prises en compte dans l'évaluation des risques.

L'anatomopathologie permet ensuite d'apprécier sur le plan microscopique et de manière semi-quantitative les modifications liées aux cellules des mêmes organes lymphoïdes (Boisseau & Perrot, 2012; Elmore, 2012). Des prélèvements complémentaires peuvent être réalisés en fonction de la voie d'administration du produit, comme par exemple les plaques de Peyer au niveau intestinal pour la voie orale, les tissus lymphoïdes associés aux bronches (*Bronchus-Associated Lymphoid Tissues* ou BALT) et les tissus lymphoïdes associés à la cavité nasale (*Nasal-Associated Lymphoid Tissues* ou NALT) pour la voie respiratoire.

Les immunoglobulines sériques sont dosées de façon non spécifique (Ig totales) ou par isotype (IgG, IgM, IgA, IgE). Cette analyse permet de montrer l'aspect général de la réponse immunitaire humorale en cas d'anomalies des globulines et en absence d'étiologies hépatiques ou rénales. Le dosage des immunoglobulines sériques se fait principalement par technique ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) et plus rarement par immunofixation. Les limites de ce dosage s'expliquent par le fait que les résultats ne sont qu'un reflet de la réponse immunitaire humorale générale. Cette technique n'est pas informative dans le suivi d'un traitement en cours car elle ne prend en compte ni la stimulation antigénique, ni la spécificité antigénique c'est-à-dire la capacité d'un antigène à être reconnu par l'immunoglobuline.

Les cytokines peuvent aussi être quantifiées afin de préciser le mécanisme d'immunotoxicité de la molécule étudiée. Cependant, plusieurs contraintes liées à leurs caractéristiques en limitent l'intérêt : elles ont une demi-vie brève, peuvent agir à longue distance et sont en faible concentration même après stimulation (de l'ordre du pg/mL) (Ai *et al.*, 2013). En effet, contrairement aux hormones qui sont sécrétées constitutivement et dont l'action est modulée en fonction de la quantité présente, les cytokines ne sont sécrétées qu'en réponse à un stimulus. Les analyses de cytokines peuvent être réalisées à partir de prélèvements de sang total ou de sérum ou à partir de cultures *ex vivo* ou *in vitro*, et peuvent concerner les molécules elles-mêmes par différentes techniques ELISA (singleplex, multiplex, ELISPOT), ou leurs ARN messagers par RT-PCR quantitative.

Enfin, l'immunophénotypage permet l'identification et l'énumération des leucocytes par l'utilisation d'anticorps spécifiques de marqueurs de surface plus ou moins spécifiques d'un type cellulaire, et la cytométrie en flux ou l'immunohistochimie. Il permet d'observer la variation quantitative de cellules d'une population (pourcentage de cellules positives) ou le taux d'expression d'un marqueur (intensité du signal par cellule). Pour les études de toxicité à doses répétées, l'immunophénotypage permet de suivre les variations des populations cellulaires pendant les périodes avec et sans exposition à la molécule (EMA, 2018b; Espenschied *et al.*, 2018).

Les tests fonctionnels en immunotoxicologie

Les tests fonctionnels renseignent sur la fonction immunitaire et aident à caractériser les mécanismes d'immunotoxicité. Ils peuvent être réalisés *in vitro* ou *in vivo*.

Tests *in vitro* et *ex vivo*

Les tests fonctionnels *in vitro* utilisant des cultures cellulaires ont été développés après l'émergence de la notion du bien-être animal et l'application de la règle des 3R. Ils englobent le test de prolifération lymphocytaire (lymphocytes B et T), la mesure de l'activité des cellules NK, le test de relargage des cytokines et la mesure de l'activité des macrophages et des polynucléaires.

Le test de prolifération lymphocytaire repose sur la capacité des lymphocytes (T ou B) à répondre à une stimulation antigénique, ce qui constitue un paramètre de l'immunité cellulaire. Cette réponse est mesurée par leur capacité de prolifération en culture *in vitro* (Oellerich *et al.*, 2012 ; Descotes, 2014). La stimulation antigénique est médiée par l'utilisation de mitogènes comme le lipopolysaccharide d'*Escherichia coli* pour les lymphocytes B et les anticorps anti-CD3 et anti-CD28 pour les lymphocytes T. La prolifération est estimée par la mesure de l'incorporation de la thymidine tritiée dans l'ADN, ou par la quantification de la bromodésoxyuridine ou de l'antigène PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) par cytométrie en flux.

L'activité des cellules NK est mesurée si l'immunophénotypage montre une anomalie numérique de ces cellules ou si une augmentation du taux d'incidence d'infections virales ou de tumeurs est observée chez les animaux lors des études précliniques. Il s'agit d'un test de relargage du chrome 51 (^{51}Cr) par les cellules cibles, en l'occurrence des cellules tumorales ne présentant pas à leur surface des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I préalablement marquées par le ^{51}Cr et qui sont lysées par les cellules NK sécrétant les perforines et les granzymes lors d'une coculture. La quantification de la radioactivité libérée par les cellules informe sur l'efficacité de la lyse des cellules cibles par les cellules NK. Des méthodes non radioactives utilisant la calcéine acétoxyméthylée (Lorenzo-Herrero *et al.*, 2020) ou l'ester succinimidyle de carboxyfluorescéine (Nagar-katti *et al.*, 2018) sont de plus en plus utilisées. L'activité cytolytique des lymphocytes TCD8+ est aussi mesurée par le test du relargage du ^{51}Cr mais nécessite une activation préalable par les lymphocytes TCD4+ helper afin d'exprimer à leur surface des récepteurs spécifiques de l'antigène.

Les macrophages et les polynucléaires jouent un rôle dans l'inflammation *via* leur capacité de migration par chimiotactisme, de phagocytose, de présentation d'antigènes ou encore de synthèse de cytokines pro-inflammatoires (Germolec *et al.*, 2018). Le chimiotactisme est évalué par le test de migration cellulaire dans une chambre de Boyden avec les cellules d'un côté de la membrane et les molécules chimio-attractantes de l'autre (Chen, 2005). La capacité migratoire est quantifiée par microscopie et comptage cellulaire, par cytométrie en flux ou par la mesure de l'impédance électrique des cellules (Taylor *et al.*, 2018). Le test de phagocytose utilise des agents immunogènes (billes de latex, particules de zymosan, bactéries, champignons) couplés avec un fluorochrome (Rumianek & Greaves, 2020). Ces agents sont incubés pendant quelques heures avec les macrophages ou les polynucléaires et phagocytés par ces derniers. Après incubation, la capacité à phagocyter des cellules est déterminée par microscopie confocale (macrophages contenant des particules fluorescentes) ou par cytométrie en flux (mesure de l'intensité de fluorescence) (Farmer & Dietert, 2013).

Enfin, le test de relargage des cytokines, bien qu'il ne soit pas présent dans l'ICH S8, est utile dans le développement des produits issus des biotechnologies. Il permet de mettre en évidence le syndrome de relargage des cytokines ou tempête cytokinique (réponse anormale par une production excessive de cytokines). Ce phénomène est observé par exemple en réponse à l'administration de certains anticorps monoclonaux thérapeutiques ou de cellules CAR-T (Grimaldi *et al.*, 2016), ou encore à la suite de toute stimulation non contrôlée du système immunitaire. Le principe consiste à mettre en culture les cellules du sang total ou les cellules mononuclées du sang périphérique en présence de la molécule à tester, et de doser les cytokines sécrétées dans le surnageant de culture par une technique ELISA.

Tests in vivo

Les tests fonctionnels *in vivo* permettent de suivre les mécanismes en aval d'un processus d'immunisation qui ne peut pas se faire *in vitro*. Ces tests fonctionnels *in vivo* comprennent l'évaluation de la réponse humorale, de l'hypersensibilité retardée et de la résistance de l'hôte.

L'évaluation de la réponse humorale est essentielle en immunotoxicologie car elle permet d'explorer l'ensemble des fonctions immunitaires liées à la réponse adaptative humorale (Lebrec *et al.*, 2011). Elle consiste à immuniser l'animal par un antigène thymo-dépendant ou thymo-indépendant.

L'évaluation de la réponse thymo-dépendante (*T-cell Dependent Antibody Response* ou TDAR) s'effectue en deux temps, avec d'abord l'immunisation des animaux par un antigène thymo-dépendant, puis la mesure des anticorps spécifiques dirigés contre cet antigène. Ce test est recommandé en première intention car il permet d'explorer les différentes composantes de l'immunité humorale comme les cellules présentatrices d'antigène, les lymphocytes T et B mais aussi la synthèse des IgM et des IgG spécifiques contre l'antigène. Ce test sera plus largement développé dans la partie suivante.

L'évaluation de la réponse thymo-indépendante (*T-cell Independent Antibody Response* ou TIAR) n'est utilisée que dans des cas très précis. En effet elle permet de déterminer l'état fonctionnel des lymphocytes B et de préciser les mécanismes toxiques de la molécule testée sur cette population cellulaire (Janeway *et al.*, 2001). Comme pour le test TDAR, l'évaluation de la réponse thymo-indépendante repose sur le principe d'immunisation puis de mesure des anticorps spécifiques (Grant *et al.*, 2012). Les antigènes thymo-indépendants utilisés sont le 2,4 dinitrophényl-Ficoll (DNP-Ficoll), le lipopolysaccharide conjugué à l'haptène 2,4,6-trinitrophényl (TNP-LPS), l'acide polyinosinique-polycytidylique (CpG) et la flagelline (Sharon *et al.*, 1975 ; Dintzis *et al.*, 1982 ; Mond *et al.*, 1995).

L'hypersensibilité retardée à un antigène permet d'évaluer l'immunité cellulaire chez les souris, les rats et les singes (Bouchez *et al.*, 2012 ; EMA, 2018b) en utilisant

le test de stimulation locale du ganglion lymphatique (*Local Lymph Node Assay* ou LLNA) ou de prolifération locale du ganglion lymphatique (*Local Lymph Node Proliferation* ou LLNP) (Potter *et al.*, 2018). Le principe de ces tests repose sur l'immunisation quotidienne des animaux avec un antigène (KLH ou *keyhole limpet hemocyanin*, ovalbumine, anatoxine tétanique ou des nanoparticules) pendant trois jours. L'antigène est appliqué sur la peau de l'oreille de l'animal dans le test LLNA et injecté dans le test LLNP. Après une phase de repos de 3 jours, la thymidine tritiée est injectée chez l'animal qui est sacrifié 6 heures plus tard et les ganglions lymphatiques sont prélevés pour analyse. Les paramètres qui sont analysés sur l'animal entier ou sur des prélèvements sont la taille de l'inflammation au niveau des oreilles (rougeur, œdème; paramètre macroscopique), l'infiltration des macrophages et des lymphocytes T au niveau des oreilles et des ganglions drainants (paramètre microscopique) et la mesure de la lymphoprolifération par la thymidine tritiée.

Enfin, l'étude de résistance de l'hôte face à l'inoculation d'un agent infectieux (bactérie, champignon, virus ou parasite), ou de cellules cancéreuses en présence de la molécule à tester, est une autre approche pour évaluer la fonction immunitaire dans sa globalité (Burlison & Burlison, 2008; Burlison *et al.*, 2018; EMA, 2018b). L'étude de résistance de l'hôte s'intéresse à la capacité d'un organisme à éliminer un agent infectieux (clairance). Ce test dure en général 28 jours et utilise deux espèces de rongeurs (rats, souris), dont l'une est le contrôle négatif. Le virus de la grippe est le modèle infectieux le plus utilisé mais d'autres agents pathogènes peuvent l'être également pour cibler une population cellulaire ou un organe spécifique. Ainsi, *Streptococcus pneumoniae* est employé pour l'étude des neutrophiles, des macrophages, des anti-inflammatoires ou de molécules ciblant TNF α , *Listeria monocytogenes* pour les cellules de Küpfler et les macrophages alvéolaires, *Candida albicans* comme modèle fongique, le cytomégalo virus murin pour la latence et la réactivation virale, et *Plasmodium yoelii* et *Trichinella spiralis* pour les modèles parasitaires. Après inoculation, la charge biologique, c'est-à-dire la quantité de micro-organismes présents dans un tissu comme le sang, la rate, le poumon ou le foie, est mesurée à différents temps. La clairance de l'agent infectieux s'appuie ainsi sur l'évolution de la charge biologique mesurée au sein de la matrice ou d'un organe. Pour les modèles tumoraux, les lignées cellulaires utilisées sont B16F10 (mélanome) et PYB6 (sarcome).

Le test TDAR en immunotoxicologie

La réponse thymo-dépendante concerne les antigènes protéiques et implique plusieurs acteurs de l'immunité, nécessitant donc une évaluation *in vivo*. Le test TDAR permet une évaluation fonctionnelle *in vivo* du système immunitaire de l'animal lorsque celui-ci reçoit un traitement expérimental. Pour évaluer cette réponse, un

antigène fortement immunogène est injecté aux animaux selon un schéma vaccinal préalablement défini (une seule ou plusieurs immunisations), et la réponse immunitaire est appréciée par la quantification (par ELISA) des anticorps IgM et IgG qui sont produits spécifiquement contre l'antigène utilisé (Peachee *et al.*, 2014). Ce test permet de suivre la réponse humorale spécifique dans des conditions reproductibles de stimulation antigénique. C'est pourquoi le test TDAR est obligatoire selon la ligne directrice 443 de l'OCDE (OECD, 2018) pour l'évaluation de produits chimiques qui ne sont pas soumis à d'autres réglementations comme c'est le cas pour les médicaments à usage humain et vétérinaire, les cosmétiques, les dispositifs médicaux, les substances radioactives, les produits agroalimentaires, les tissus d'origine humaine ou animale. Il est ensuite recommandé en première intention par la ligne directrice ICH S8 pour l'évaluation de l'immunotoxicité lorsque le produit testé cible les cellules de l'immunité, ou si une immunotoxicité est fortement suspectée par ailleurs (Tableau 2). Il permet notamment de détecter des phénomènes d'immunodépression en cas de diminution de la réponse mais peut aussi être adapté pour révéler les immunostimulations (schéma vaccinal et doses différentes). Comme pour les autres techniques utilisées en immunotoxicité, différents paramètres doivent être déterminés pour effectuer un test TDAR.

Choix de l'espèce

Le choix de l'espèce suit la ligne directrice ICH S8. Contrairement à l'homme, le chien et le singe, les rongeurs ne possèdent pas de système immunitaire fonctionnel à la naissance (Martin, 2010), il est donc recommandé d'utiliser des rongeurs âgés d'au moins 42 jours pour de tels tests. L'effectif par groupe et par sexe trouvé dans la littérature reprend les recommandations de la ligne directrice OPPTS 870.7800 (US EPA, 1996c), avec 8–10 pour les rongeurs, 5 pour les non rongeurs et 3 pour les primates non humains. Les groupes d'animaux utilisés dans un test TDAR sont en général au nombre de 5, incluant un groupe témoin négatif recevant le solvant de l'antigène, un groupe témoin positif recevant une molécule connue pour avoir un effet immunosuppresseur puissant comme le cyclophosphamide, la dexaméthasone ou la cyclosporine (Thériaque, 2021a, 2021b, 2021c) et trois groupes recevant la molécule à tester à différentes doses (faible, moyenne et élevée) (Plitnick & Herzyk, 2010).

Choix de l'antigène

Le choix d'un antigène thymo-dépendant est une étape critique dans l'élaboration du test TDAR. En effet, cet antigène va conditionner l'immunisation de l'animal mais aussi le dosage analytique (fixé au fond des puits de la plaque d'ELISA, il va être reconnu par les anticorps IgM et IgG présents dans l'échantillon à doser). Un antigène thymo-dépendant idéal à administrer doit être immunogène (sans besoin d'adjuvants), faible en endotoxines et

Tableau 3. Comparaison des différents antigènes utilisés pour le test TDAR (Lebrec *et al.*, 2014). Les comparaisons sont basées sur le type d'utilisation possible, les espèces animales immunisables ainsi que sur les avantages et les inconvénients liés à l'efficacité d'immunisation et la gestion des réactifs. HBsAg : antigène de surface du virus de l'hépatite B ; KLH : *keyhole limpet hemocyanin* ; Φ X174 : bactériophage phiX174 ; NHP, primates non humains ; SRBC : érythrocytes de mouton ; TT : *tetanus toxoid*.

Antigène	Utilisation principale	Espèce	Avantages	Inconvénients
KLH	Médicaments	Rongeurs NHP Chien Mini porc	Immunogène Plusieurs espèces	Réaction croisée avec d'autres anticorps
SRBC	Produits phytosanitaires	Rongeurs NHP	Immunogène Pesticides	Pas pour les médicaments Source d'origine Faible stabilité
TT	Mémoire immunitaire	NHP	Immunogène Clinique	Animaux déjà immunisés Associé avec adjuvant
HBsAg	Mémoire immunitaire	NHP	Immunogène Clinique	
ΦX174	Immuno-compétence	Vertébrés	Immunogène Plusieurs espèces	Non commercialisé

utilisable chez différentes espèces animales (Lebrec *et al.*, 2014). Le tableau 3 reprend les principales caractéristiques d'antigènes utilisés pour le test TDAR.

Keyhole limpet hemocyanin (KLH) est une protéine de grande taille (4–8 MDa, 600–800 kDa par sous-unité), issue d'un mollusque marin (*Megathura crenulata*), qui transporte l'oxygène. KLH est l'antigène le plus couramment employé car il donne des résultats d'immunisation robustes chez les mammifères, peut être utilisé comme transporteur pour les haptènes ou en tant qu'adjuvant, est facilement accessible dans le commerce et permet l'évaluation de la réponse primaire (IgM) comme secondaire (IgG) par technique ELISA (Plitnick & Herzyk, 2010). Son inconvénient réside dans la présence potentielle d'une réactivité croisée au niveau des anticorps anti-KLH chez les primates non humains (NHP). En effet, l'épitope de KLH possède une structure proche de celui d'un antigène présent chez le parasite *Schistosoma mansoni* (Geyer *et al.*, 2005), qui a un taux d'infection élevé chez les NHP (environ 10 % chez les souches africaines) (Richards *et al.*, 2019). Cette réactivité croisée peut donc rendre l'interprétation des résultats délicate car le modèle animal ayant rencontré le parasite présente une concentration d'anticorps plus élevée qu'un animal naïf. Dans ce cas, il n'est pas possible d'évaluer la fonction immunitaire à la suite d'une primo-immunisation à la KLH.

Les érythrocytes de mouton (*Sheep Red Blood Cells* ou SRBC), qui présentent une très bonne immunogénicité (Ladics, 2018), ont été historiquement le premier type d'antigène utilisé dans le test TDAR. Ils constituent l'antigène d'immunisation pour les tests TDAR dirigés contre les produits environnementaux (pesticides) et

autres produits chimiques selon la ligne directrice 870.7800 de l'OPPTS (US EPA, 1996c). Ils sont moins employés dans le domaine pharmaceutique car ils ont une faible stabilité et une durée de conservation relativement brève. Le choix de la source d'approvisionnement constitue donc une étape critique dans l'élaboration d'un test TDAR utilisant cet antigène. De plus, les SRBC sont déconseillés pour immuniser les chiens car des réactions d'hypersensibilité ont été décrites (Haggerty, 2007). Enfin, la récupération des SRBC nécessite de sacrifier les animaux pour prélever la rate, contrairement aux autres antigènes.

Le vaccin contre le tétanos (*tetanus toxoid* ou TT) est une anatoxine de la bactérie *Clostridium tetani*, l'agent infectieux du tétanos (Rabadi & Brady, 2022). Pour le test TDAR, cet antigène peut être utilisé comme alternative à la KLH car il induit une réponse clinique plus visible (érythème, épaissement cutané, œdème) (Bouchez *et al.*, 2012). La majorité des hommes et des primates utilisés comme animaux de laboratoire étant déjà vaccinée contre cette bactérie, il est important de confirmer le statut vaccinal d'un primate non humain avant immunisation. Un inconvénient est que la plupart des vaccins commercialisés contiennent un adjuvant (par exemple l'hydroxyde d'aluminium) qui peut entraîner une exacerbation de la réponse immunitaire. De ce fait, le TT est plutôt utilisé pour étudier la fonction de mémoire immunitaire (rappel vaccinal).

La protéine HBsAg est un antigène de surface situé au niveau de l'enveloppe du virus de l'hépatite B. Sa présence dans le sérum du patient est un marqueur d'infection par ce virus. Par ses caractéristiques immunogènes, la protéine

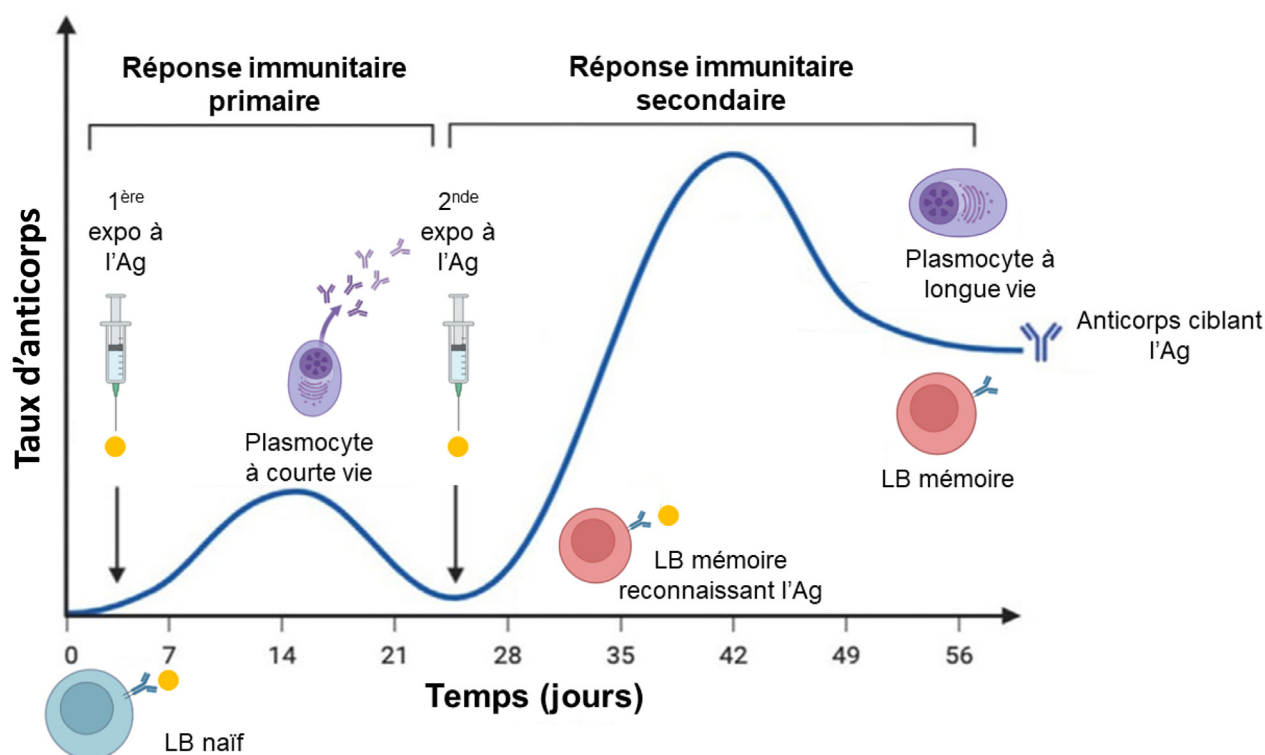


Figure 1. Évolution du taux d'anticorps selon le nombre d'immunisations. Les pics de concentration d'anticorps ciblant l'antigène se situent en général au 14^e jour pour la réponse immunitaire primaire puis au 42^e jour pour la réponse immunitaire secondaire suivant la première exposition. Ag : antigène ; LB : lymphocyte. (Figure inspirée de Mahalingam *et al.*, 2021).

HBsAg fait partie de la composition du vaccin contre l'hépatite B (Kaul, 2013). Cette protéine HBsAg est une alternative à l'utilisation de la KLH d'une part pour la facilité de son approvisionnement (vaccin) et d'autre part pour une utilisation plus sûre satisfaisant aux exigences réglementaires de qualité et de sécurité avant la mise sur le marché (ScienceDirect, 2017). De nos jours, cet antigène est devenu quasiment historique en raison d'une meilleure disponibilité de la KLH. La protéine HBsAg est moins rencontrée chez les NHP que le TT, elle est donc utilisable pour mimer une primo-infection avant l'étude des mécanismes de rappel. Par ailleurs, la réponse immunitaire est plus importante et moins variable qu'avec le TT.

Le bactériophage phiX174 (Φ X174) est un virus à ADN simple brin circulaire de la famille des *Microviridae* (Logel & Jaschke, 2020). Un des avantages de cet antigène est la possibilité de l'utiliser comme agent d'immunisation chez plusieurs espèces animales (mammifères et autres vertébrés). L'inconvénient majeur de Φ X174 est sa difficulté d'approvisionnement, cet antigène n'étant pas commercialisé (Orange *et al.*, 2012). En conséquence, cela limite l'utilisation de Φ X174 aux études non cliniques.

Choix de la dose et de la voie d'administration

L'administration de l'antigène se fait par voie parentérale, avec des doses qui dépendent de l'antigène, de la voie et de l'espèce utilisés (Tableau 4).

Choix de la durée de traitement

Bien que la ligne directrice ICH S8 recommande de réaliser une étude de 28 jours en moyenne, plusieurs critères tels que la demi-vie des anticorps IgM et IgG, les mécanismes résolutifs suivant l'immunisation mais aussi la nouvelle réponse à la suite de la deuxième immunisation, peuvent conditionner la durée, notamment lorsque la mémoire immunitaire est évaluée. Comme illustré dans la figure 1, la deuxième exposition induit une réponse immunitaire plus efficace que la première, montrant l'importance de réaliser une étude longue afin de pouvoir observer cet effet. Le moment de l'immunisation est également un critère à prendre en compte dans l'élaboration du protocole d'étude. L'immunisation peut être réalisée une ou deux fois selon les besoins de l'étude. Par exemple, pour générer des contrôles positifs, une seule immunisation suffit car la réponse est déjà importante, tandis que pour évaluer la mémoire immunitaire, deux immunisations sont nécessaires (American College of Toxicology, 2020). L'administration de la molécule à évaluer et du cyclophosphamide se fait au premier jour de l'étude. La figure 2 présente des exemples de protocole d'étude pour le test TDAR sur une durée de 28 jours. Dans ce cas, la première immunisation est réalisée à J7 chez les singes et à J14 chez les rongeurs (Burns-Naas & Pallardy, 2013 ; Kawai *et al.*, 2013). Pour une étude de plus longue durée (3 mois), deux immunisations sont réalisées afin

Tableau 4. Choix de la dose et de la voie d'administration selon l'espèce et l'antigène (Lebrec *et al.*, 2014 ; Peachee *et al.*, 2014). HBsAg : antigène de surface du virus de l'hépatite B ; IV : intraveineux ; IM : intramusculaire ; KLH : *keyhole limpet hemocyanin* ; LF : limite de floculation ; PFU : *plate forming unit* (nombre de virus par plaque) ; Φ X174 : bactériophage phiX174 ; SC : sous-cutané ; SRBC : érythrocytes de mouton ; TT : *tetanus toxoid*.

Espèce	Antigène	Voie	Dose
Rat	KLH	SC	0,1–2 mg/animal
		IV	300 µg/animal
	SRBC	IV	0,5 mL de 4×10^8 SRBCs/mL
	Φ X174	IV	1×10^{10} PFU/kg
Souris	KLH	SC	0,1–2 mg/animal
	SRBC	IV	0,2 mL de 1×10^9 SRBCs/mL
	Φ X174	IV	1×10^{10} PFU/kg
NHP	KLH	SC	1–10 mg/animal
		IM	0,1–10 mg/animal
	TT	IM	5 LF/animal
	HBsAg	IM	10–20 µg/animal
	Φ X174	IV	2×10^{10} PFU/kg
Chien	KLH	IV	10 mg/animal
		IM	10 mg/animal
Mini porc	KLH	SC	2–10 mg/animal

d'évaluer les réponses primaire et secondaire, la deuxième immunisation étant effectuée 4 à 6 semaines après la première afin de laisser le taux d'anticorps diminuer (Figure 1) (Bannish, 2018). Les prélèvements sanguins se font en général tous les 7 jours à partir du premier jour d'immunisation.

Choix de la méthode analytique

La méthode analytique doit permettre la quantification du taux d'anticorps dirigés contre l'antigène d'immunisation. La majorité des tests TDAR utilise une technique ELISA (directe, indirecte, par compétition ou en sandwich) mais on peut trouver dans la littérature l'électro-chimio-luminescence ou encore la technique *Plaque-Forming Cell Assay* (PFC) (Tableau 5). Les tests ELISA sont ceux classiquement utilisés en immunologie. L'électro-chimio-luminescence implique la détection de la lumière produite par une réaction électrochimique, grâce au couplage de l'anticorps de détection avec un luminophore à base de

ruthénium ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$). Enfin, le PFC consiste à quantifier le nombre de plasmocytes dans la rate après immunisation (souris ou rat) par les SRBC (Ladics, 2018). Quatre à cinq jours après immunisation par ces cellules, l'animal est sacrifié, les splénocytes sont isolés et mis en suspension dans du sérum de cochon d'Inde (contenant les facteurs du complément) avec les SRBC et une solution d'agar-agar. Cette suspension est incubée dans une boîte de Pétri pendant 3 heures à 37°C. Les plasmocytes vont produire des anticorps IgM anti-SRBC qui diffusent dans la boîte de Pétri, reconnaissent l'antigène SRBC et s'y fixent. Ils vont ensuite changer de conformation et activer la cascade du complément. Le système du complément va induire la lyse des SRBC et la décoloration de la zone (appelée « plaque »). L'observation se fait au microscope et les plaques sont comptées. Cela permet de déterminer le « PFC », à savoir le nombre de cellules qui produisent des anticorps et donc de plaques par rate ou par million de splénocytes. Les avantages et inconvénients de ces trois méthodes analytiques sont repris dans le tableau 5. La

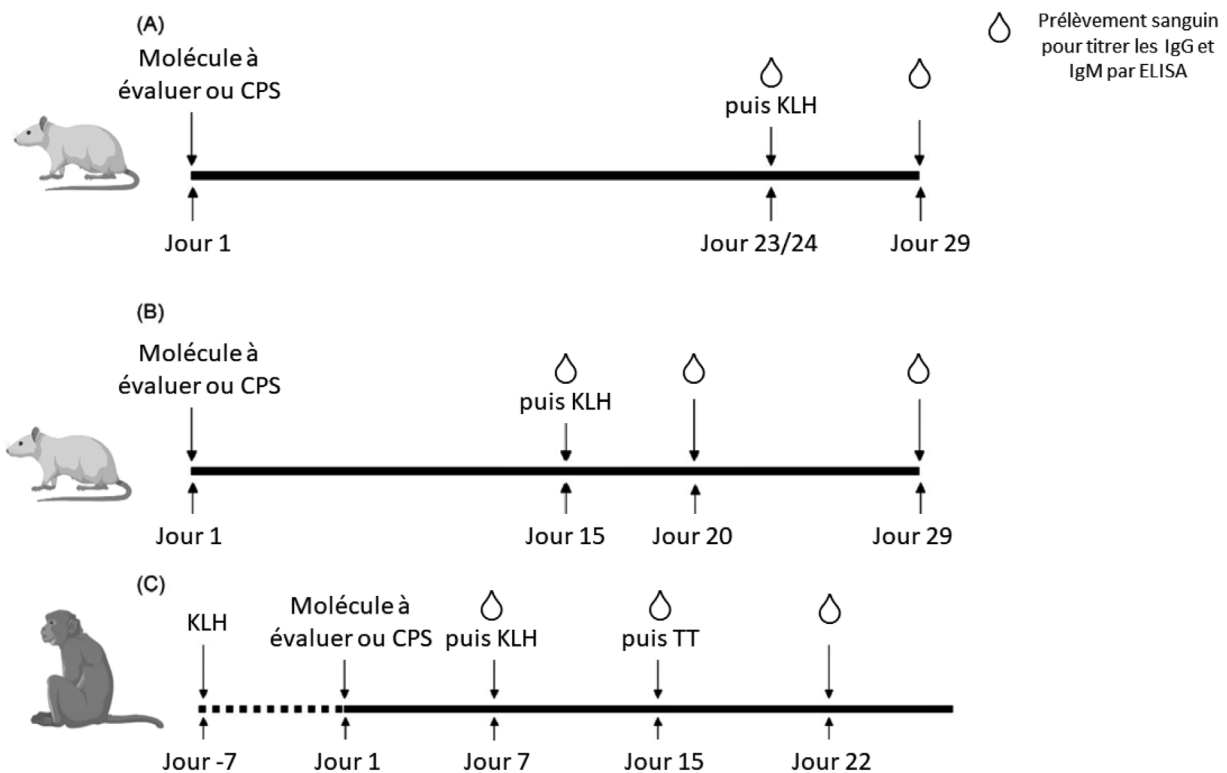


Figure 2. Exemples de plans d'étude pour le test TDAR. Le CPA a été administré quotidiennement par voie orale. (A) Les rats sont immunisés par injection intraveineuse de la KLH au jour 23 ou 24 de l'étude. Le sang est prélevé à la fin de l'étude (ici au jour 29) afin de récupérer le sérum et de titrer les IgM anti-KLH par ELISA. (B) Les rats sont immunisés en milieu d'étude (ici au jour 15). Des prélèvements sanguins sont réalisés au jour 20 et au jour 29 afin d'évaluer respectivement les réponses primaire (IgM) et secondaire (IgG). (C) Les singes sont immunisés deux fois, 7 jours avant et après le début de l'étude, par un premier antigène (KLH) afin d'évaluer l'impact de la molécule sur la réponse secondaire anti-KLH. Le TT est administré deux semaines après le début de l'étude afin d'évaluer l'impact de la molécule sur la réponse primaire anti-TT. Ce plan d'étude permet d'évaluer la fonction immunitaire sur deux antigènes différents. CPS : cyclophosphamide (immunosuppresseur) ; ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay* ; IgG : immunoglobulines G ; IgM : immunoglobulines M ; KLH : *keyhole limpet hemocyanin* ; TT : *tetanus toxoid* (Figure inspirée de Burns-Naas & Pallardy, 2013, et Kawai *et al.*, 2013).

validation des méthodes intègre la précision évaluée par le coefficient de variation (CV) qui doit être inférieur à 30 %. Les techniques ELISA et ECL permettent plus facilement de respecter ce critère.

Conclusion et perspectives

L'immunotoxicologie étudie le dysfonctionnement immunitaire à la suite d'une exposition à un xénobiotique. Cette branche récente de la toxicologie est de nos jours de plus en plus demandée dans l'évaluation de la sécurité de divers produits de consommation avant leur commercialisation, dont les médicaments (notamment les immunomodulateurs et les produits issus des biotechnologies). L'approche par palier permet d'évaluer un potentiel risque immunotoxique par des tests observationnels cliniques et biologiques, puis de confirmer cet effet par des tests fonctionnels si nécessaire. Le test fonctionnel de première intention en immunotoxicologie est le test TDAR qui évalue chez l'animal *in vivo* la capacité du système immunitaire à établir une réponse humorale thymo-dépendante après une

immunisation par un antigène. Cette capacité est modifiée par les molécules immunotoxiques. L'analyse du test TDAR repose couramment sur la titration des anticorps IgG et IgM anti-KLH par technique ELISA. Bien que considéré comme le *gold standard* des tests fonctionnels en immunotoxicologie, le test TDAR ne dispose pas de protocole standardisé permettant aux laboratoires d'adapter leur procédure.

L'enjeu majeur pour l'évaluation de l'immunotoxicité dans les différents domaines (santé, agroalimentaire, chimie...) devrait être le remplacement d'animaux de laboratoire par des essais fiables et reproductibles utilisant du matériel biologique standardisé et facile d'accès comme des lignées cellulaires. De nouveaux tests permettent l'étude de tel ou tel paramètre ou lignée cellulaire de façon isolée (Yao *et al.*, 2020), ce qui diminue l'utilisation des animaux tout en augmentant le nombre d'expériences à effectuer. Cependant, la corrélation entre les résultats des tests *in vitro* et la réalité *in vivo* n'est au mieux que partielle (Galbiati *et al.*, 2010 ; Dobrovolskaia & McNeil, 2013 ; Hartung & Corsini, 2013). Afin de garantir une pertinence biologique des tests, ceux-ci devraient intégrer

Tableau 5. Comparaison des méthodes analytiques utilisées pour le test TDAR (Lebrec *et al.*, 2014). ECL : électrochimiluminescence ; ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay* ; HBsAg : antigène de surface du virus de l'hépatite B ; IgG : immunoglobulines G ; IgM : immunoglobulines M ; KLH : *keyhole limpet hemocyanin* ; NHP : primates non humains ; PFC : *plaque forming cell* ; SRBC : érythrocytes de mouton ; TT : *tetanus toxoid*.

Critère	ELISA	ECL	PFC
Application	Biologie, chimie, petites molécules	Biologie	Chimie, petites molécules
Espèce	Souris, rat, chien, NHP, humain	Rat, NHP, homme	Souris, rat
Antigène	KLH, SRBC, TT, HBsAg	KLH	SRBC
Matrice	Sérum	Sérum	Splénocytes (suspension)
Détection	IgG (sous-classes), IgM	IgG (sous-classes), IgM	IgM
Précision (CV)	< 20 %	< 20 %	20–30 %
Sensibilité	ng/mL	ng/mL	100 PFC/10 ⁶ splénocytes
Lecture	Automatique	Automatique	Manuelle
Avantages	Peu coûteux, reproductible, grande diversité d'applications	Moins de variabilité des résultats pour les IgM	Méthode connue, faible réactivité croisée
Inconvénients	Manque de spécificité entre espèces, réactifs et contrôles variables, interférence avec les grosses molécules	Coûteux, espèces et antigènes limités	Sacrifice de l'animal, pas de taux d'anticorps, stabilité SRBC, antigènes et espèces limités

un ensemble de cellules différentes représentées dans des proportions et des niveaux d'activité et d'activation similaires à ceux trouvés dans l'organisme, voire dans différents organes. Cela semble aujourd'hui une perspective difficile à atteindre, mais les technologies actuelles permettant l'élaboration et l'étude d'organoïdes, de sphéroïdes et de tissus bio-imprimés devraient permettre le développement d'outils pouvant remplacer du moins partiellement, petit à petit, l'emploi d'animaux dans ces tests. Une autre voie de recherche réside dans l'utilisation d'autres animaux, peut-être mieux tolérés au niveau sociétal, comme les moules et les oursins (Auguste *et al.*, 2022).

Références

- Ai, W., Li, H., Song, N., Li, L., Chen, H. (2013). Optimal method to stimulate cytokine production and its use in immunotoxicity assessment. *Int J Environ Res Public Health*, 10, 3834–3842.
- American College of Toxicology. (2020). Fundamental approaches to immunotoxicity assessment in preclinical safety studies. <https://interact.actox.org/viewdocument/fundamental-approaches-to-immunotox>.
- Anderson, S.E., Shane, H.L. (2018). Investigative immunotoxicology. *Methods Mol Biol*, 1803, 27–46.
- Auguste, M., Melillo, D., Corteggio, A., Marino, R., Canesi, L., Pinsino, A., Italiani, P., Boraschi, D. (2022). Methodological approaches to assess innate immunity and innate memory in marine invertebrates and humans. *Front Toxicol*, 4, 842469.
- Bannish, G. (2018). The importance of immunopharmacology in non-clinical safety assessment of immune-oncology biotherapeutics. <https://www.toxicology.org/groups/rc/NorCal/docs/20180501-presentation-greg-bannish-v2.pdf>.
- Boisseau, C., Perrot, S. (2012). Évaluation de l'immunotoxicité d'une molécule pharmaceutique (chimique ou biologique) en développement : Bilan des tests disponibles et proposition d'un arbre de décisions pour l'identification des dangers et l'évaluation du risque immunotoxique, *École vétérinaire de Maisons-Alfort*, Maisons-Alfort, pp. 1-206.
- Bouchez, C., Gervais, F., Fleurance, R., Palate, B., Legrand, J.-J., Descotes, J. (2012). Development of a Delayed-Type Hypersensitivity (DTH) model in the Cynomolgus monkey. *J Toxicol Pathol*, 25, 183-188.

- Boverhof, D.R., Ladics, G., Luebke, B., Botham, J., Corsini, E., Evans, E., Germolec, D., Holsapple, M., Loveless, S.E., Lu, H., van der Laan, J.W., White, K.L., Yang, Y. (2014). Approaches and considerations for the assessment of immunotoxicity for environmental chemicals: A workshop summary. *Regul Toxicol Pharmacol*, 68, 96-107.
- Burleson, G.R., Burleson, F.G. (2008). Testing human biologicals in animal host resistance models. *J Immunotoxicol*, 5, 23-31.
- Burleson, S.C.M., Freebern, W.J., Burleson, F.G., Burleson, G. R., Johnson, V.J., Luebke, R.W. (2018). Host resistance assays. *Methods Mol Biol*, 1803, 117-145.
- Burns-Naas, L., Pallardy, M. (2013). Immunotoxicology, in: *Nonclinical Safety Assessment: A Guide to International Pharmaceutical Regulations*, John Wiley & Sons, Ltd., New Jersey, pp. 313-346.
- Chen, H.-C. (2005). Boyden chamber assay. *Methods Mol Biol*, 294, 15-22.
- Corsini, E., Loveren, H.V. (2014). *Molecular immunotoxicology* (1st ed.), Wiley-VCH, Weinheim, pp. 1-329.
- De Jong, W.H., Van Loveren, H. (2007). Screening of xenobiotics for direct immunotoxicity in an animal study. *Methods*, 41, 3-8.
- Dean, J.H. (2004). A brief history of immunotoxicology and a review of the pharmaceutical guidelines. *Int J Toxicol*, 23, 83-90.
- Dean, J.H., Padarathsingh, M.L., Jerrells, T.R. (1979). Assessment of immunobiological effects induced by chemicals, drugs or food additives. I. Tier testing and screening approach. *Drug Chem Toxicol*, 2, 5-17.
- Dean, J.H., Hincks, J.R., Remandet, B. (1998). Immunotoxicology assessment in the pharmaceutical industry. *Toxicol Lett*, 102-103, 247-255.
- Descotes, J. (2009). Immunotoxicity of monoclonal antibodies. *MAbs*, 1(2), 104-111.
- Descotes, J. (2012). Safety immunopharmacology: Evaluation of the adverse potential of pharmaceuticals on the immune system. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 66, 79-83.
- Descotes, J. (2014). Immune system, in: P. Wexler (Ed.), *Encyclopedia of toxicology* (3rd ed.), Academic Press, pp. 1004-1023.
- Dintzis, R.Z., Vogelstein, B., Dintzis, H.M. (1982). Specific cellular stimulation in the primary immune response: Experimental test of a quantized model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79, 884-888.
- Dobrovolskaia, M.A., McNeil, S.E. (2013). Understanding the correlation between *in vitro* and *in vivo* immunotoxicity tests for nanomedicines. *J Control Release*, 172, 456-466.
- Elmore, S.A. (2012). Enhanced histopathology of the immune system: A review and update. *Toxicol Pathol*, 40, 148-156.
- EMA. (2018a). ICH S6 (R1) Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. <https://www.ema.europa.eu/en/ich-s6-r1-preclinical-safety-evaluation-biotechnology-derived-pharmaceuticals>.
- EMA. (2018b). ICH S8 Immunotoxicity studies for human pharmaceuticals. <https://www.ema.europa.eu/en/ich-s8-immunotoxicity-studies-human-pharmaceuticals>.
- Espenschied, S.T., Tighe, R.M., Gowdy, K.M. (2018). Flow cytometry for the immunotoxicologist. *Methods Mol Biol*, 1803, 183-197.
- Farmer, J.T., Dietert, R.R. (2013). Chapter 10—Immunotoxicology assessment in drug development, in: A.S. Faqi (Ed.), *A comprehensive guide to toxicology in nonclinical drug development* (2nd ed.), Academic Press, pp. 247-262.
- Galbiati, V., Mitjans, M., Corsini, E. (2010). Present and future of *in vitro* immunotoxicology in drug development. *J Immunotoxicol*, 7, 255-267.
- Germolec, D., Luebke, R., Rooney, A., Shipkowski, K., Vandebriel, R., van Loveren, H. (2017). Immunotoxicology: A brief history, current status and strategies for future immunotoxicity assessment. *Curr Opin Toxicol*, 5, 55-59.
- Germolec, D.R., Shipkowski, K.A., Frawley, R.P., Evans, E. (2018). Markers of inflammation. *Methods Mol Biol*, 1803, 57-79.
- Geyer, H., Wuhrer, M., Resemann, A., Geyer, R. (2005). Identification and characterization of keyhole limpet hemocyanin N-glycans mediating cross-reactivity with *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem*, 280, 40731-40748.
- Grant, C.F., Lefevre, E.A., Carr, B.V., Prentice, H., Gubbins, S., Pollard, A.J., Charreyre, C., Charleston, B. (2012). Assessment of T-dependent and T-independent immune responses in cattle using a B cell ELISPOT assay. *Vet Res*, 43, 68.
- Grimaldi, C., Finco, D., Fort, M.M., Gliddon, D., Harper, K., Helms, W.S., Mitchell, J.A., O'Lone, R., Parish, S.T., Piche, M.-S., Reed, D.M., Reichmann, G., Ryan, P.C., Stebbings, R., Walker, M. (2016). Cytokine release: A workshop proceedings on the state-of-the-science, current challenges and future directions. *Cytokine*, 85, 101-108.
- Haggerty, H.G. (2007). Immunotoxicity testing in non-rodent species. *J Immunotoxicol*, 4, 165-169.
- Hartung, T., Corsini, E. (2013). Immunotoxicology: Challenges in the 21st century and *in vitro* opportunities. *ALTEX*, 30, 411-426.
- Janeway, C.J., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J. (2001). B-cell activation by armed helper T cells, in: *Immunobiology: The immune system in health and disease* (5th ed.), Garland Science, New York, pp. 402-426.
- Karmaus, P.W.F., Karmaus, A.L. (2018). Challenges for integrating immunotoxicology into the twenty-first-century toxicology testing paradigm. *Methods Mol Biol*, 1803, 385-396.
- Kaul, R. (2013). Chapter 917—Hepatitis, in: *The immunoassay handbook* (4th ed.), Elsevier, Amsterdam, pp. 901-911.
- Kawabata, T.T., Evans, E.W. (2012). Development of immunotoxicity testing strategies for immunomodulatory drugs. *Toxicol Pathol*, 40, 288-293.
- Kawai, R., Ito, S., Aida, T., Hattori, H., Kimura, T., Furukawa, T., Mori, K., Sanbuissho, A., Kawada, T. (2013). Evaluation of primary and secondary responses to a T-cell-dependent antigen, keyhole limpet hemocyanin, in rats. *J Immunotoxicol*, 10, 40-48.
- Koller, L.D. (2001). A perspective on the progression of immunotoxicology. *Toxicology*, 160, 105-110.
- Kuper, C.F., van Bilsen, J., Cnossen, H., Houben, G., Garthoff, J., Wolterbeek, A. (2016). Development of immune organs and functioning in humans and test animals: Implications for immune intervention studies. *Reprod Toxicol*, 64, 180-190.
- Ladics, G.S. (2018). The sheep erythrocyte T-Dependent Antibody Response (TDAR). *Methods Mol Biol*, 1803, 83-94.
- Lebec, H., Cowan, L., Lagrou, M., Krejsa, C., Neradilek, M.B., Polissar, N.L., Black, L., Bussière, J. (2011). An inter-laboratory retrospective analysis of immunotoxicological endpoints in non-human primates: T-cell-dependent antibody responses. *J Immunotoxicol*, 8, 238-250.
- Lebec, H., Molinier, B., Boverhof, D., Collinge, M., Freebern, W., Henson, K., Mytych, D.T., Ochs, H.D., Wange, R., Yang, Y., Zhou, L., Arrington, J., Christin-Piché, M.S., Shenton, J. (2014). The T-cell-dependent antibody response assay in nonclinical studies of pharmaceuticals and chemicals: Study design, data analysis, interpretation. *Regul Toxicol Pharmacol*, 69, 7-21.

- Logel, D.Y., Jaschke, P.R. (2020). A high-resolution map of bacteriophage ϕ X174 transcription. *Virology*, 547, 47-56.
- Lorenzo-Herrero, S., Sordo-Bahamonde, C., González, S., López-Soto, A. (2020). Evaluation of NK cell cytotoxic activity against malignant cells by the calcein assay. *Methods Enzymol*, 631, 483-495.
- Luster, M.I. (2014). A historical perspective of immunotoxicology. *J Immunotoxicol*, 11, 197-202.
- Mahalingam, S., Peter, J., Xu, Z., Bordoloi, D., Ho, M., Kalyanaraman, V.S., Srinivasan, A., Muthumani, K. (2021). Landscape of humoral immune responses against SARS-CoV-2 in patients with COVID-19 disease and the value of antibody testing. *Heliyon*, 7, e06836.
- Martin, P.L. (2010). Chapter 17 – Reproductive toxicity testing for biopharmaceuticals, in: *Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals*, John Wiley & Sons Ltd., New Jersey, pp. 1-21.
- Meunier, S., de Bourayne, M., Hamze, M., Azam, A., Correia, E., Menier, C., Maillère, B. (2020). Specificity of the T cell response to protein biopharmaceuticals. *Front Immunol*, 11, 1550.
- Mond, J.J., Vos, Q., Lees, A., Snapper, C.M. (1995). T cell independent antigens. *Curr Opin Immunol*, 7, 349-354.
- Nagarkatti, M., Rieder, S.A., Nagarkatti, P.S. (2018). Evaluation of cell proliferation and apoptosis in immunotoxicity testing. *Methods Mol Biol*, 1803, 209-230.
- OECD. (1998). Test No. 409: Repeated dose 90-day oral toxicity study in non-rodents. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-409-repeated-dose-90-day-oral-toxicity-study-in-non-rodents_9789264070721-en.
- OECD. (2008). Test No. 407: Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-407-repeated-dose-28-day-oral-toxicity-study-in-rodents_9789264070684-en.
- OECD. (2018). Test No. 443: Extended one-generation reproductive toxicity study. https://www.oecd-ilibrary.org/fr/environment/test-no-443-extended-one-generation-reproductive-toxicity-study_9789264185371-en.
- OECD. (2022). Test No. 406: Skin sensitisation. https://www.oecd-ilibrary.org/fr/environment/test-no-406-skin-sensitisation_9789264070660-en.
- Oellerich, M., Brandhorst, G., Shipkova, M., Wieland, E. (2012). Chapter 16 – Biomarkers: The link between therapeutic drug monitoring and pharmacodynamics of immunosuppressants, in: A. Dasgupta (Ed.), *Therapeutic drug monitoring*, Academic Press, pp. 349-372.
- Orange, J.S., Ballou, M., Stiehm, E.R., Ballas, Z.K., Chinen, J., De La Morena, M., Kumararatne, D., Harville, T.O., Hesterberg, P., Koleilat, M., McGhee, S., Perez, E.E., Raasch, J., Scherzer, R., Schroeder, H., Seroogy, C., Huissoon, A., Sorensen, R.U., Katial, R. (2012). Use and interpretation of diagnostic vaccination in primary immunodeficiency: A working group report of the Basic and Clinical Immunology Interest Section of the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *J Allergy Clin Immunol*, 130, S1-S24.
- Peachee, V.L., Smith, M.J., Beck, M.J., Stump, D.G., White, K.L. (2014). Characterization of the T-dependent antibody response (TDAR) to keyhole limpet hemocyanin (KLH) in the Göttingen minipig. *J Immunotoxicol*, 11, 376-382.
- Peyton Myers, L. (2018). Clinical immunotoxicology. *Methods Mol Biol*, 1803, 15-26.
- Plitnick, L.M., Herzyk, D.J. (2010). The T-dependent antibody response to keyhole limpet hemocyanin in rodents. *Methods Mol Biol*, 598, 159-171.
- Plunkett, L.M., Kaplan, A.M., Becker, R.A. (2010). An enhanced tiered toxicity testing framework with triggers for assessing hazards and risks of commodity chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol*, 58, 382-394.
- Potter, T.M., Neun, B.W., Dobrovolskaia, M.A. (2018). *In vitro* and *in vivo* methods for analysis of nanoparticle potential to induce delayed-type hypersensitivity reactions. *Methods Mol Biol*, 1682, 197-210.
- Rabadi, T., Brady, M.F. (2022). Tetanus toxoid. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557415/>.
- Richards, L., Erko, B., Ponpetch, K., Ryan, S.J., Liang, S. (2019). Assessing the nonhuman primate reservoir of *Schistosoma mansoni* in Africa: A systematic review. *Infect Dis Poverty*, 8, 32.
- Rumianek, A.N., Greaves, D.R. (2020). How have leukocyte *in vitro* chemotaxis assays shaped our ideas about macrophage migration? *Biology*, 9, E439.
- ScienceDirect. (2017). Hepatitis B surface antigen – An overview. <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/hepatitis-b-surface-antigen>.
- Sharon, R., McMaster, P.R., Kask, A.M., Owens, J.D., Paul, W.E. (1975). DNP-Lys-ficoll: A T-independent antigen which elicits both IgM and IgG anti-DNP antibody-secreting cells. *J Immunol*, 114, 1585-1589.
- Taylor, L., Recio, C., Greaves, D.R., Iqbal, A.J. (2018). *In vitro* migration assays. *Methods Mol Biol*, 1784, 197-214.
- The European Commission. (2018). Commission Regulation (EU) 2018/1881. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2006/1907>.
- Thériaque. (2021a). Monographie DEXAMETHASONE MYL 4MG/1ML SOL INJ. https://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?id=14274&type=SP&popup=1&imprimer=1&info%5B%5D=COMPO&info%5B%5D=CLASS&info%5B%5D=GENE&info%5B%5D=CHOIX&info%5B%5D=ADMIN&info%5B%5D=CONSV&info%5B%5D=INDIC&info%5B%5D=NON_INDIC&info%5B%5D=POSO&info%5B%5D=C_INDIC&info%5B%5D=PRE_C_EMP&info%5B%5D=N_C_INDIC&info%5B%5D=INTER&info%5B%5D=GROSSESSE&info%5B%5D=CONDUITE&info%5B%5D=EFFET.
- Thériaque. (2021b). Monographie ENDOXAN 1000MG PDR INJ. https://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?id=8878&type=SP&popup=1&imprimer=1&info%5B%5D=COMPO&info%5B%5D=CLASS&info%5B%5D=GENE&info%5B%5D=CHOIX&info%5B%5D=ADMIN&info%5B%5D=CONSV&info%5B%5D=INDIC&info%5B%5D=NON_INDIC&info%5B%5D=POSO&info%5B%5D=C_INDIC&info%5B%5D=PREC_EMP&info%5B%5D=N_C_INDIC&info%5B%5D=INTER&info%5B%5D=GROSSESSE&info%5B%5D=CONDUITE&info%5B%5D=EFFET.
- Thériaque. (2021c). Monographie SANDIMMUN 50MG/ML SOL INJ AMP 1ML. https://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?id=4073&type=SP&popup=1&imprimer=1&info%5B%5D=COMPO&info%5B%5D=CLASS&info%5B%5D=GENE&info%5B%5D=CHOIX&info%5B%5D=ADMIN&info%5B%5D=CONSV&info%5B%5D=INDIC&info%5B%5D=NON_INDIC&info%5B%5D=POSO&info%5B%5D=C_INDIC&info%5B%5D=PRE_C_EMP&info%5B%5D=N_C_INDIC&info%5B%5D=INTER&info%5B%5D=GROSSESSE&info%5B%5D=CONDUITE&info%5B%5D=EFFET.
- US EPA. (1996a). Biochemicals test guidelines: OPPTS 880.3550 immunotoxicity. <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPPT-2009-0158-0005>.

- US EPA. (1996b). Biochemicals test guidelines: OPPTS 880.3800 immune response. <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPPT-2009-0158-0006>.
- US EPA. (1996c). Health effects test guidelines: OPPTS 870.7800 immunotoxicity. <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPPT-2009-0156-0049>.
- Vos, J.G., Moore, J.A. (1977). Immune suppression as related to toxicology. *CRC Crit Rev Toxicol*, 5, 67-101.
- Yao, W., Ding, M., Bao, L., Zhao, Y., Wang, D., Li, Y., Qu, Y., Hao, C. (2020). Human monocyte-derived dendritic cells as an in vitro alternative model cell to evaluate the immunotoxicity of 2, 4-Dinitrochlorobenzene. *Toxicol Lett*, 330, 118-127.

Citation de l'article : Nguyen, C. et Jordheim, L.P. (2022). Évaluation de l'immunotoxicité en recherche et dans le cadre du développement biomédical. *Biologie Aujourd'hui*, **216**, 167-181