

► Pour assurer la sécurité du patient lors des études cliniques ou de la mise sur le marché d'un médicament, la toxicologie a bénéficié ces dernières années de l'essor des nouvelles connaissances qu'elles soient scientifiques, techniques ou bio-informatiques. Celles-ci ont permis la mise au point de modèles expérimentaux *in silico*, *in vitro* et *in omic* qui, sans remplacer l'évaluation effectuée en grande partie sur l'animal de laboratoire, permettent d'éliminer très en amont des molécules à toxicité rédhibitoire contribuant ainsi à la diminution du nombre d'animaux utilisés. De plus, ces modèles particulièrement adaptés aux études mécanistiques permettent d'améliorer la pertinence des résultats obtenus et donc de mieux prévoir et dépister les effets indésirables qui pourraient être observés chez l'homme. Des progrès restent encore à faire, notamment au niveau de la validation. Cependant, l'effort consenti par les industriels, les laboratoires académiques et les instances réglementaires devrait, dans les années à venir, améliorer de façon significative l'évaluation de la sécurité non clinique de médicaments par l'intégration de ces méthodes. ◀

L'objectif de l'évaluation de la sécurité non clinique des médicaments, autrement appelée toxicologie, est de prévoir les effets indésirables ou toxiques afin de sécuriser leur emploi chez le patient, tant lors des essais cliniques que de la mise sur le marché. Réglementairement, cette évaluation est codifiée par les lignes directrices ICH (*International Conference on Harmonisation*), et s'effectue essentiellement sur l'animal de laboratoire. Néanmoins, les progrès scientifiques, techniques et bio-informatiques ont mis à la disposition des toxicologues de nouveaux outils prédictifs qui, sans remplacer l'animal de laboratoire dans l'état actuel de nos connaissances, permettent d'éliminer très en amont des molécules à toxicité rédhibitoire, et ainsi diminuer le nombre d'animaux

La place des méthodes *in silico*, *in vitro*, *in omic* dans l'évaluation de la sécurité des médicaments

Nancy Claude, Françoise Goldfain-Blanc,
André Guillouzo



N. Claude, F. Goldfain-Blanc :
Institut de Recherches
Internationales Servier,
6, place des Pléiades,
92415 Courbevoie, France.
nancy.claude@fr.netgrs.com

A. Guillouzo : Inserm U620
et Université de Rennes 1,
35043 Rennes, France.

utilisés. Ces techniques, *in silico*, *in vitro* et *in omic*, contribuent au respect du principe des 3 R (*Reduce, Refine, Replace*) énoncé par Russel et Burch en 1959 [1] et intégré dans l'encadrement législatif actuel relatif à l'expérimentation animale. Elles permettent en outre de comprendre certains mécanismes de toxicité et de mieux évaluer la pertinence pour le patient des effets observés chez l'animal.

Les méthodes *in silico*

Ces méthodes, également appelées les SAR ou (Q)SAR pour (*Quantitative*) *Structure-Activity Relationships* ou « systèmes experts », font appel à des outils informatiques, d'où leur nom « *in silico* ».

Les SAR représentent une relation entre la structure d'un composé ou d'une classe de composés et un effet biologique, et donnent une réponse de type oui/non. Les (Q)SAR utilisent des modèles mathématiques plus élaborés et donnent des réponses plus complètes. Ces deux catégories reposent sur des bases de données obtenues d'après des études *in vivo* ou *in vitro*, ou d'après des observations d'études cliniques, et les relient par des corrélations statistiques aux informations structurales. La qualité des (Q)SAR dépend donc de la qualité de la base de données utilisée.

Actuellement, ces méthodes *in silico* jouent un rôle d'orientation pour l'évaluation de produits pour lesquels aucune donnée n'est disponible. Un exemple est



la recherche du potentiel génotoxique d'une molécule. Cette recherche s'effectue très tôt dans le processus de développement, dès l'étape de *screening*, afin d'éviter la sélection d'une molécule présentant à terme un risque cancérigène.

Parmi les nombreux modèles disponibles, l'industrie pharmaceutique va privilégier ceux qui ont été validés, comme DEREK [2] ou MCASE [3], très utilisés pour le médicament mais aussi dans l'industrie chimique, et reconnus par les instances réglementaires. Ces bases sont enrichies en permanence par les utilisateurs, ce qui augmente d'année en année leur prédictivité. L'utilisation est très simple : la structure du produit à étudier est saisie grâce à un logiciel de dessin, et le programme applique les lois de relation structure-activité contenues dans le répertoire, ainsi que toutes les données toxicologiques. Le système prédit la toxicité du produit et fournit les éléments sur lesquels il se fonde pour cette prédiction (commentaires, références bibliographiques, données de toxicité...). Ceci permet à l'utilisateur de savoir dans quelle mesure il est en accord avec les prédictions, d'envisager des modifications de structure afin d'obtenir un produit moins toxique, et de conduire une étude bibliographique plus poussée si nécessaire. Ces modèles *in silico* ont évidemment des limites : pour la génotoxicité, leur prédictivité n'est pas totale (concordance de 65,6 % à 88 %). La combinaison de 3 systèmes (DEREK, MCASE et Awork) permet d'augmenter la concordance (98,7 %) [4].

Concernant le potentiel de toxicité chronique, le potentiel cancérigène ou la toxicité sur le processus de la reproduction, la prédictivité est limitée car ces effets indésirables résultent d'une multitude de variables, elles-mêmes influencées par divers mécanismes. Néanmoins, pour l'industrie pharmaceutique qui utilise une quantité impressionnante de produits chimiques, cette approche devient incontournable dans le domaine du *screening* des futurs médicaments, mais également dans l'évaluation de la toxicité des matières premières et des intermédiaires de synthèse pour assurer la sécurité au poste de travail de ses employés. Un rapport de l'ECB (*European Chemicals Bureau*) suggère que l'utilisation optimale des méthodes *in silico* dans le cadre de REACH¹ pourrait diminuer les besoins en animal de laboratoire de 1,3 à 1,9 millions [5].

Les méthodes *in vitro*

Le terme *in vitro* s'oppose au terme *in vivo*, ces méthodes pouvant être complémentaires ou alternatives à l'expérimentation animale. Les méthodes *in vitro* sont de plus en plus utilisées non seulement lors des étapes

¹ REACH est le nouveau Règlement sur l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques. Il est entré en vigueur le 1^{er} juin 2007. REACH rationalise et améliore l'ancien cadre réglementaire de l'Union européenne (UE) sur les produits chimiques. Les principaux objectifs de REACH sont de mieux protéger la santé humaine et l'environnement contre les risques que peuvent poser les produits chimiques, la promotion de méthodes d'essai alternatives, la libre circulation des substances au sein du marché intérieur et de renforcer la compétitivité et l'innovation. REACH fait porter à l'industrie la responsabilité d'évaluer et de gérer les risques posés par les produits chimiques et de fournir des informations de sécurité adéquates à leurs utilisateurs. (source : Commission européenne).

de *screening*, mais aussi au cours du développement du médicament. Leur facilité de mise en œuvre, leur isolement de tout contexte physiologique qui permet d'étudier un mécanisme d'action toxique, et surtout la possibilité d'utiliser des cellules humaines qui permettent de s'affranchir des différences interspèces, en font un outil incontournable. Ce dernier point est particulièrement vrai pour les cellules hépatiques. En effet, si les différences de réponse interspèces sont limitées pour une cardiotoxicité ou une hématotoxicité, elles sont fréquentes pour une hépatotoxicité. Près du tiers des molécules qui se révèlent hépatotoxiques dans les essais cliniques ne provoquent aucune lésion hépatique chez l'animal [6]. Cette faible corrélation dans le cas du foie est principalement due à des différences dans les voies et les cinétiques de biotransformation des médicaments et aux variations individuelles dans la réponse humaine, liée à des facteurs génétiques, physiopathologiques et/ou environnementaux.

Les modèles hépatiques humains sont donc *a priori* les plus pertinents pour l'acquisition de données ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion). Ils incluent des systèmes cellulaires (tranches de foie, hépatocytes primaires et lignées de cellules hépatiques) et subcellulaires (fractions S9, microsomes, enzymes recombinantes), chaque modèle ayant ses propres intérêts et limites pour préciser les paramètres cinétiques ou établir le profil métabolique d'une molécule, caractériser les enzymes impliquées dans sa biotransformation, démontrer une inhibition ou une induction enzymatique ou encore prédire d'éventuelles interactions avec d'autres composés [7, 8]. Ces données sont aujourd'hui requises par les agences réglementaires et des recommandations sont publiées par la FDA (*Food and Drug Administration* aux États-Unis). Dans l'ensemble on observe une bonne corrélation avec les résultats *in vivo*.

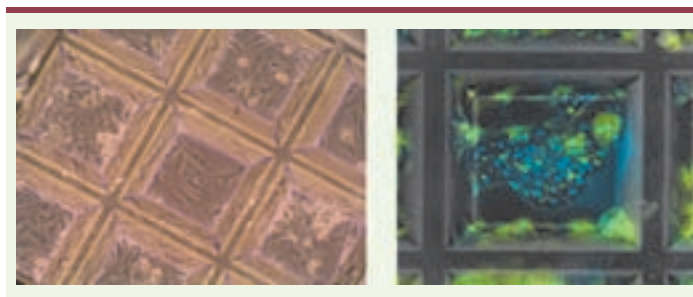


Figure 1. Puce à cellules utilisant des cellules HepaRG. **A.** Cellules indifférenciées et proliférantes. **B.** Cellules différenciées avec marquage des noyaux (bleu) et des canalicules biliaires (vert) (Christiane Guguen-Guillouzo, Plate-forme Imagerie-Puce à cellules, Génopôle Ouest, Rennes, France).



Qu'il s'agisse de prédiction ou de mécanismes d'action, l'hépatotoxicité ne peut logiquement être évaluée qu'à partir de cellules humaines compétentes sur le plan métabolique. Jusqu'ici les études *in vitro* ont surtout été réalisées à partir d'hépatocytes primaires, exposés à un traitement unique, à des concentrations élevées et avec des calculs d'IC50 à l'aide de tests conventionnels. Ceux-ci, nombreux (morphologiques, biochimiques ou métaboliques) et de sensibilité variable, ont conduit à des résultats discutables et il n'existe toujours pas de méthode de référence pour l'évaluation de la toxicité aiguë. Les hépatocytes primaires ont aussi permis de reproduire certains types de toxicité, comme la formation de métabolites réactifs (paracétamol), la phospholipidose (amiodarone, maléate de perhexiline) ou des altérations de type cholestatique. Ils ne sont

cependant pas adaptés pour détecter une stéatose caractérisée par l'accumulation de vésicules lipidiques intracytoplasmiques, une fibrose ou une toxicité de type idiosyncratique (imprévisible) apparaissant après des traitements longs et répétés. Il est vraisemblable que des traitements réitérés (chroniques) des systèmes cellulaires *in vitro* seront nécessaires pour répondre à ce défi.

Si pour le foie une cellule, l'hépatocyte, est la cible majeure, dans d'autres tissus (rénal, pulmonaire, nerveux,...) différents types cellulaires sont des cibles potentielles importantes. On dispose de plusieurs modèles cellulaires primaires et certaines lignées sont représentatives du néphron *in vivo*. En revanche, les modèles *in vitro* existants ne permettent pas d'évaluer correctement le potentiel neurotoxique de composés chimiques.

Aussi, de nouvelles stratégies de toxicologie prédictive et mécanistique sont actuellement développées, reposant sur des modèles cellulaires et des méthodologies plus adaptées. Beaucoup d'espoirs reposent sur l'obtention de lignées de différents types cellulaires

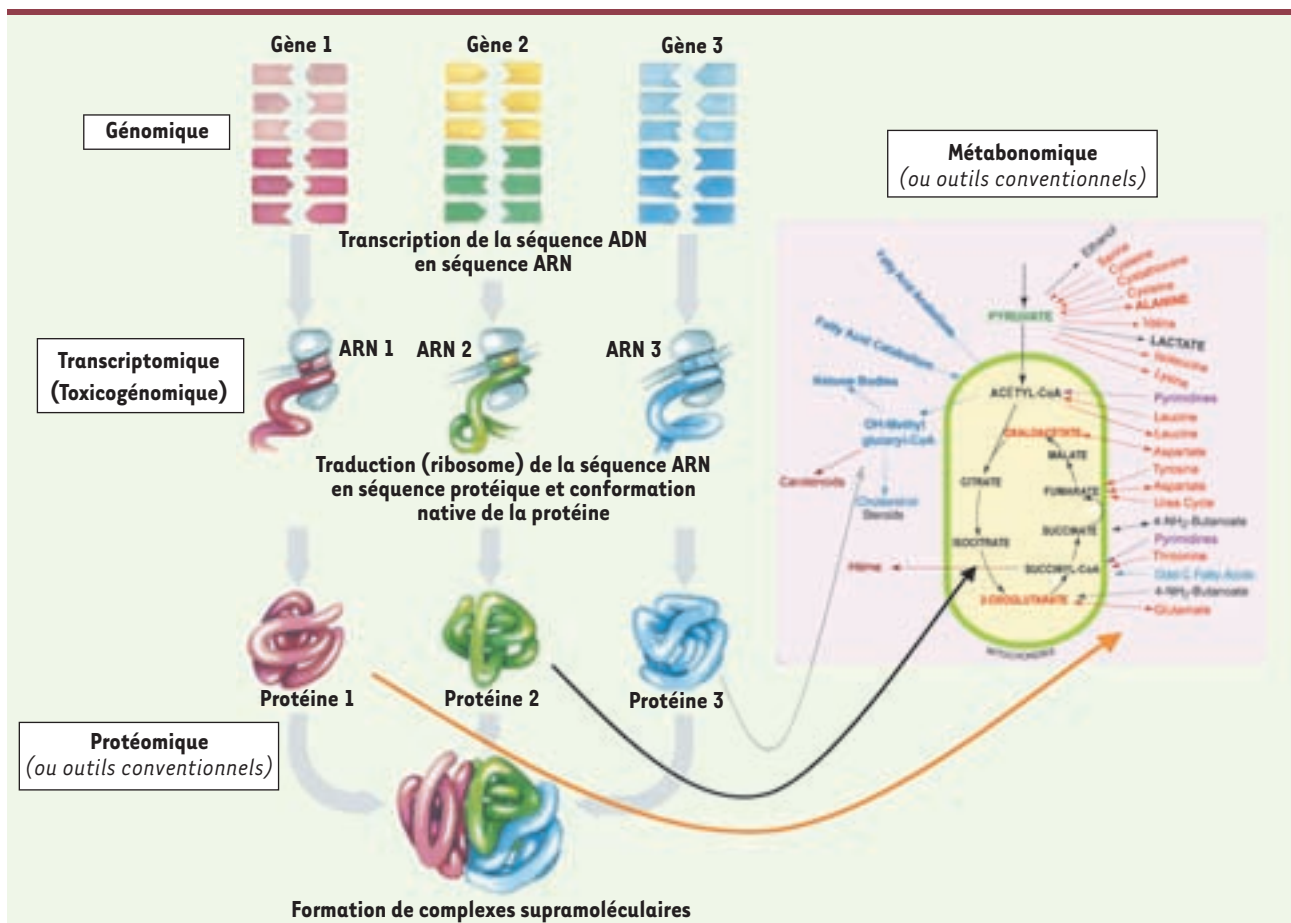


Figure 2. Les différentes technologies « Omics » en toxicologie. La terminologie « omic » s'utilise pour des analyses à différents niveaux cellulaires. 1. Génomique ou pharmacogénomique, pour les modifications géniques, très utilisée pour l'analyse de différents variants et le typage de certaines populations dans les essais thérapeutiques ou les patients mais peu utilisée en toxicologie. 2. Transcriptomique ou Toxicogénomique, très utilisée en toxicologie, et concernant les surexpressions ou les répressions des ARNm après traitement par une molécule candidate. 3. Protéomique, qui peut valider les hypothèses émises d'après la toxicogénomique, et mettre en valeur des phénomènes de régulation post-transcriptionnels. 4. Métabonomique, qui mesure le résultat à l'échelle de la cellule ou de l'organisme des modifications primaires subcellulaires (phénotype métabolique).

provenant de la différenciation de cellules souches humaines mais des étapes restent à franchir [9]. Dans l'attente, les cellules HepaRG, une nouvelle lignée d'hépatome humain, semblent représenter aujourd'hui le modèle le plus pertinent pour des études de toxicité hépatique aiguë et chronique [10-12]. Elles possèdent à la fois la capacité de biotransformation des hépatocytes humains primaires et le potentiel de croissance indéfinie des lignées d'hépatome. Une étude récente a montré une toxicité concentration-dépendante et cumulative de l'aflatoxine B1 liée à la formation d'époxydes par le CYP3A4 dans ces cellules [13]. Ces cellules HepaRG permettront donc probablement de reproduire *in vitro* des lésions hépatiques consécutives à des traitements réitérés, en particulier une stéatose voire une fibrose en les associant avec des cellules étoilées.

Pour répondre aux besoins de *screening* à moyen/haut débit, les cellules primaires, de par leur disponibilité limitée et leur hétérogénéité fonctionnelle, sont peu appropriées au contraire des lignées (telles

que les cellules HepaRG) qui représentent des modèles bien maîtrisés, stables et reproductibles. De nouvelles approches reposant sur l'utilisation de puces à cellules couplée à l'imagerie sont en cours de validation. Ces puces nécessitent peu de cellules (quelques centaines par point) et permettent de visualiser 3 ou 4 marqueurs par cellule (Figure 1). Un tel équipement est actuellement utilisé pour le *screening* de nouvelles molécules anticancéreuses dérivées de produits de la mer.

Méthodes « in omic »

Parmi les disciplines émergentes en toxicologie, les technologies reconnaissables par le suffixe « omic » ont pris une place prépondérante au cours de ces dernières années et sont toujours en constante évolution. L'apparition des « omics » a permis d'envisager une meilleure prédiction de

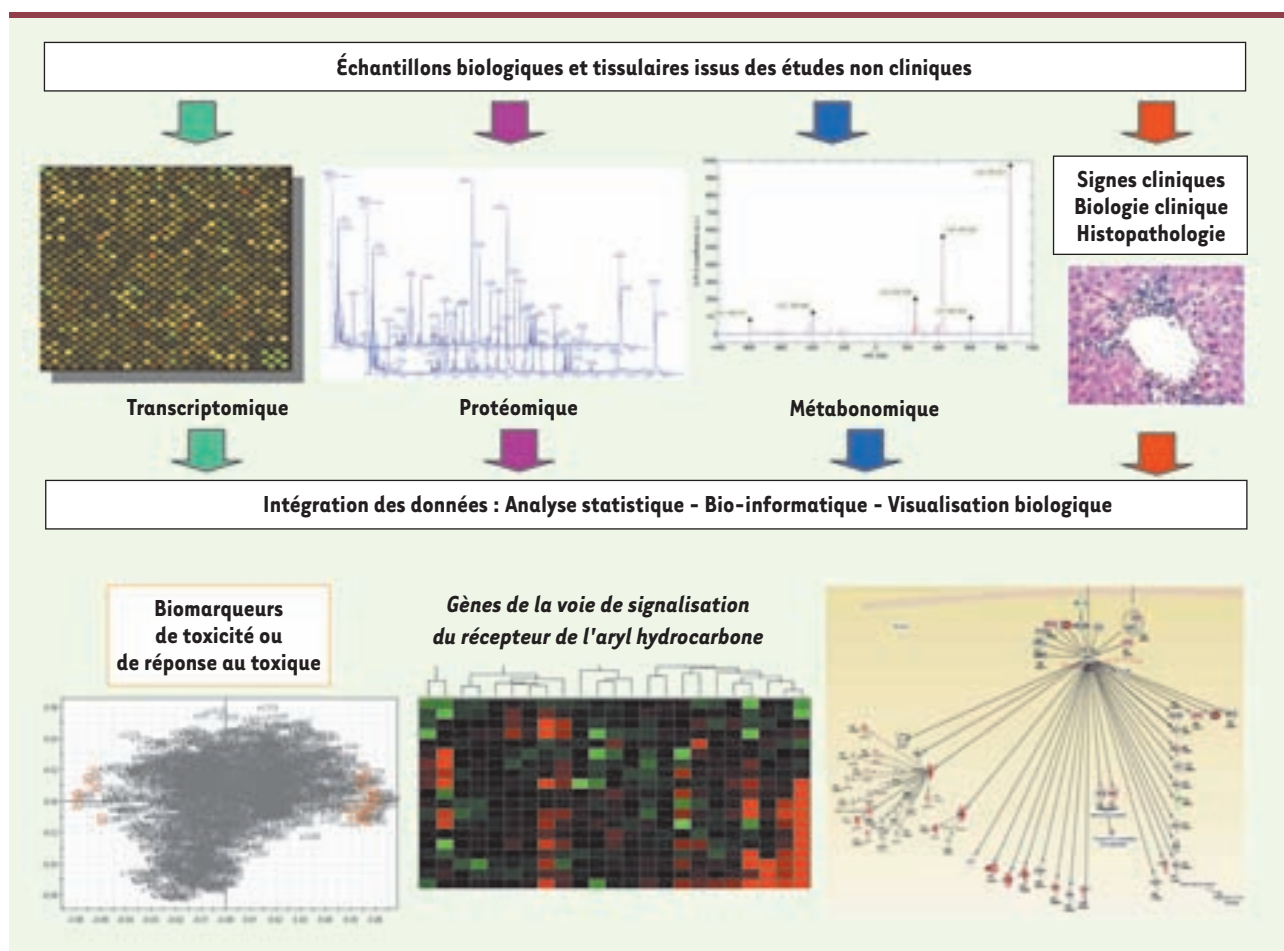


Figure 3. Intégration d'une plate-forme Omics. Cette figure schématise les différents niveaux d'analyse et d'intégration des données « omics » entre elles et avec les données issues d'outils plus conventionnels. L'analyse de plusieurs milliers de données ne peut se faire que grâce à des plates-formes informatiques et des outils statistiques permettant de trier et sélectionner les variables d'intérêt, pour ensuite analyser les modifications observées sur le plan biologique et toxicologique. Là encore, des outils bio-informatiques sont indispensables pour replacer les modifications dans des voies de signalisation connues ou des listes de transcrits ou métabolites déjà reconnues comme signatures de phénomènes toxiques.



la toxicité des nouvelles molécules, soit plus précocement lorsqu'elles sont utilisées comme outils prédictifs, soit plus précisément en tant qu'outils mécanistiques.

Ces technologies sont fondées sur le fait qu'un événement physiologique, pharmacologique ou toxicologique va modifier la composition protéique et l'activité des cellules, donc leur fonction. Les modifications peuvent être détectées à différents niveaux cellulaires (Figure 2). En toxicologie, il s'agit souvent d'évaluer les profils (ou signatures) de modifications obtenus après exposition à un produit et de les comparer à des profils témoins ou caractéristiques de toxicités connues.

La toxicogénomique

Elle s'intéresse aux modifications de l'expression des gènes en réponse à un médicament, un toxique ou une pathologie [14] ; le terme « transcriptomique » serait plus juste, puisque ce sont les ARNm qui sont mesurés, souvent par des puces à ADN ou par RT-PCR. C'est la technologie « omic » prépondérante en toxicologie, associée aux outils traditionnels, tels que l'histologie ou la biologie clinique.

La protéomique

Elle est souvent utilisée en complément des analyses transcriptomiques, par la mesure quantitative et qualitative des protéines dans un tissu. En effet, les nombreux phénomènes post-transcriptionnels peuvent faire que les modifications des ARNm ne soient pas traduites en modifications fonctionnelles ou quantitatives des protéines. Les techniques le plus souvent utilisées sont l'électrophorèse en deux dimensions ou la spectrométrie de masse.

La métabonomique ou métabolomique

Ce sont deux termes maintenant considérés comme équivalents, leur distinction étant plus historique que scientifique [15]. La métabonomique est « la mesure quantitative au cours du temps de la réponse métabolique d'un biosystème à un stimulus pathophysiologique ou une modification génétique » [16]. Il s'agit de mesurer la réponse finale de l'organisme via l'analyse globale des molécules de faible poids moléculaire (acides aminés, acides organiques, sucres, lipides...) dans un échantillon biologique ou un tissu. L'intérêt est la détection de biomarqueurs de toxicité facilement accessibles, et donc leur possible extrapolation à l'homme. En raison de la variété chimique des molécules détectées, différentes techniques sont associées telles que RMN (résonance magnétique nucléaire) ou spectrométrie de masse (LC-MS, GC-MS, etc.).

Un intérêt majeur des « omics » est de prédire les effets à long terme d'un produit via leur utilisation dans des

essais à court terme. Il est admis que des toxiques agissant par le même mécanisme d'action entraînent des profils de dérégulation génique ou métabonomique similaires et caractéristiques. En regroupant les profils de toxiques bien connus et en reliant ces dérégulations à leur expression phénotypique, une « signature » caractéristique de la toxicité considérée peut être établie et l'on peut donc prédire très tôt les éventuels effets d'une molécule candidate. Ce type d'analyse nécessite des bases de données suffisamment importantes pour être prédictives. De nombreuses publications ont déjà établi, par exemple, des listes de gènes ou de métabolites potentiellement prédictifs d'hépatotoxicité selon divers mécanismes [17], de néphrotoxicité [18] ou de carcinogénéité [19]. Dans ce cas, des signatures transcriptomiques discriminant un mode d'action génotoxique ou non génotoxique ont été obtenues après traitement de rats durant 14 jours avec des carcinogènes connus et prédisent à 88 % les résultats d'études de cancérogenèse obtenus après 2 ans de traitement. Le même type d'approche existe en protéomique [20].

Les « omics » sont également largement utilisés dans la compréhension des mécanismes de toxicité, indispensable pour évaluer la pertinence interspèce des effets observés ou établir des seuils de sécurité (Figure 3). La recherche du mécanisme peut conduire à l'identification de marqueurs précoces de toxicité, permettant d'utiliser l'information pour sélectionner d'autres candidats. Par exemple, le mécanisme de la phospholipidose a été caractérisé au niveau transcriptionnel dans le modèle de lignée humaine HepG2 [21]. L'analyse a révélé une douzaine de gènes directement liés au mécanisme de stockage des phospholipides dans la cellule et pouvant être utilisés comme marqueurs prédictifs de la toxicité.

Sur le plan réglementaire, la FDA comme l'EMA (*European Medicines Agency*) se montrent très attentives à l'essor de ces nouvelles techniques et ont chacune créé un groupe multidisciplinaire de réflexion et d'évaluation de ces données. Leurs missions sont de préparer la réglementation à ces évolutions, d'élaborer ou d'adapter les lignes directrices pour la soumission de telles données, d'évaluer les dossiers concernés ou de participer à différents groupes ou consortiums conjointement aux industriels et aux académiques. Les soumissions des données « omics » sont encouragées par des textes tels que les « *Voluntary Genomic Data Submission* » (VGDS), étendues aux « *Voluntary Omics Data Submissions* » (VXDS), applicables aux niveaux Européen ou Américain. Ces initiatives viennent d'aboutir à la validation de 7 nouveaux marqueurs de néphrotoxicité [22] plus prédictifs et précoces que les traditionnels urée/créatinine pour la détection d'une atteinte rénale aiguë. Par ailleurs, les agences participent à la mise en place des standards techniques par des initiatives comme le projet MAQC (*MicroArray Quality Control*), visant à évaluer les performances des différentes technologies, méthodes d'analyse et la reproductibilité des résultats selon les plates-formes ou les laboratoires [23].

Conclusion

Les modèles expérimentaux en toxicologie ont évolué avec le développement de nouvelles techniques en biologie cellulaire, moléculaire et de bio-informatique. Il n'existe pas de modèle unique pour répondre à toutes les questions biomédicales, mais le déploiement des méthodes *in*

silico, *in vitro* et *in omic* ainsi que leur validation et leur reconnaissance au niveau réglementaire permet à la fois d'améliorer la détection précoce des effets indésirables et d'avoir recours à l'animal de laboratoire plus en aval dans le développement de nouveaux médicaments. Ceci représente un progrès considérable en termes de pertinence des données obtenues tout en diminuant le nombre d'animaux de laboratoire utilisés. ♦

SUMMARY

In silico, *in vitro*, *in omic* experimental models and drug safety evaluation

Over the last few decades, toxicology has benefited from scientific, technical, and bioinformatic developments relating to patient safety assessment during clinical and drug marketing studies. Based on this knowledge, new *in silico*, *in vitro*, and « *omic* » experimental models are emerging. Although these models cannot currently replace classic safety evaluations performed on laboratory animals, they allow compounds with unacceptable toxicity to be rejected in the early stages of drug development, thereby reducing the number of laboratory animals needed. In addition, because these models are particularly adapted to mechanistic studies, they can help to improve the relevance of the data obtained, thus enabling better prevention and screening of the adverse effects that may occur in humans. Much progress remains to be done, especially in the field of validation. Nevertheless, current efforts by industrial, academic laboratories, and regulatory agencies should, in coming years, significantly improve preclinical drug safety evaluation thanks to the integration of these new methods into the drug research and development process. ♦

RÉFÉRENCES

1. Russel WMS, Burch RL. *The principles of human experimental technique (1959)*. Universities Federation for Animal Welfare (UFAW). Herts, UK : Potters Bar, 1992 (special edition) : 238 p.
2. Greene N, Judson PN, Langowski JJ, Marchant CA. Knowledge-based expert systems for toxicity and metabolism prediction: DEREK, StAR and METEOR. *SAR QSAR Environ Res* 1999 ; 10 : 299-314.
3. Rosenkranz HS, Cunningham AR, Zhang YP, et al. Development, characterization and application of predictive-toxicology models. *SAR QSAR Environ Res* 1999 ; 10 : 277-98.
4. Hayashi M, Kamata E, Hirose A, et al. *In silico* assessment of chemical mutagenesis in comparison with results of Salmonella microsome assay on 909 chemicals. *Mutat Res* 2005 ; 588 : 129-35.
5. Lewis A, Kazantis N, Fishtik I, et al. Integrating process safety with molecular modelling-based risk assessment of chemicals within REACH regulatory framework: benefit and future challenges. *J Hazard Mat* 2007 ; 142 : 592-602.
6. Olson H, Betton G, Robinson D, et al. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul Toxicol Pharmacol* 2000 ; 32 : 56-67.
7. Guillouzo A. Liver cell models in *in vitro* toxicology. *Environ Health Perspect* 1998 ; 106 (suppl 2) : 511-32.
8. Hewitt NJ, Lechón MJ, Houston JB, et al. Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. *Drug Metab Rev* 2007 ; 39 : 159-234.
9. Mannello F, Tonti GA. Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! *Stem Cells* 2007 ; 25 : 1603-9.
10. Gripon P, Rumin S, Urban S, et al. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis b virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ; 99 : 15655-60.
11. Cerec V, Glaise D, Garnier D, et al. Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma heparg cell line through bipotent progenitor. *Hepatology* 2007 ; 45 : 957-67.
12. Aninat C, Piton A, Glaise D, et al. Expression of cytochromes p450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma heparg cells. *Drug Metab Dispos* 2006 ; 34 : 75-83.
13. Josse R, Aninat C, Glaise D, et al. Long-term functional stability of human heparg hepatocytes and use for chronic toxicity and genotoxicity studies. *Drug Metab Dispos* 2008 ; 36 : 1111-8.
14. Suter L, Babiss LE, Wheeldon EB. Toxicogenomics in predictive toxicology in drug development. *Chem Biol* 2004 ; 11 : 161-71.
15. Robertson DG. Metabonomics in toxicology: a review. *Toxicol Sci* 2005 ; 85 : 809-22.
16. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999 ; 29 : 1181-9.
17. McMillian M, Nie A, Parker B, et al. Drug-induced oxidative stress in rat liver from a toxicogenomic perspective. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005 ; 207 : 171-8.
18. Wang EJ, Snyder RD, Fielden MR, et al. Validation of putative biomarkers of nephrotoxicity in rats. *Toxicology* 2008 ; 246 : 91-100.
19. Ellinger-Ziegelbauer H, Gmuender H, Badenburger A, Ahr HJ. Prediction of a carcinogenic potential of rat hepatocarcinogens using toxicogenomics analysis of short-term *in vivo* studies. *Mutat Res* 2008 ; 637 : 23-39.
20. Fella K, Gluckmann M, Hellmann J, et al. Use of two-dimensional gel electrophoresis in predictive toxicology: Identification of potential early protein biomarkers in chemically induced hepatocarcinogenesis. *Proteomics* 2005 ; 5 : 1914-27.
21. Sawada H, Takami K, Asahi S. A toxicogenomic approach to drug-induced phospholipidosis: analysis of its induction mechanism and establishment of a novel *in vitro* screening system. *Toxicol Sci* 2005 ; 83 : 282-92.
22. European Medicines Agency (EMA). *Final report on the pilot joint EMA/FDA VXDS experience on qualification of nephrotoxicity biomarkers*. EMA, 2008 (Ref EMA/250885/2008).
23. MAQC Consortium. The microarray quality control (MAQC) project shows inter and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnol* 2006 ; 24 : 1151-61.

TIRÉS À PART

N. Claude