

**Développement de méthodes alternatives en  
expérimentation animale : caractérisation de la toxicité  
et du métabolisme in vitro de xénobiotiques au sein de  
biopuces hépatiques et rénales**

Céline Brochot

► **To cite this version:**

Céline Brochot. Développement de méthodes alternatives en expérimentation animale : caractérisation de la toxicité et du métabolisme in vitro de xénobiotiques au sein de biopuces hépatiques et rénales. Rapport Scientifique INERIS, 2013, 2012-2013, pp.20-22. ineris-01869452

**HAL Id: ineris-01869452**

**<https://hal-ineris.archives-ouvertes.fr/ineris-01869452>**

Submitted on 6 Sep 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# Développement de méthodes alternatives en expérimentation animale : caractérisation de la toxicité et du métabolisme *in vitro* de xénobiotiques au sein de biopuces hépatiques et rénales

CONTRIBUTRICE



Céline Brochot

**E**n complément des systèmes *in vitro* traditionnels, les systèmes microfluidiques ont connu récemment un fort développement. Ces microsystèmes, appelés aussi biopuces, permettent une culture cellulaire dans un fluide circulant afin de reproduire l'organisation des cellules au sein des tissus ainsi que les conditions physiologiques d'écoulement qui apportent *in vivo* des nutriments, de l'oxygène ou des xénobiotiques aux cellules cibles. Parce que cette nouvelle génération de tests *in vitro* est conceptuellement différente des systèmes traditionnels, il apparaît essentiel d'évaluer leur pertinence pour des applications en toxicologie ou pharmacologie, notamment dans le cadre du

développement de méthodes alternatives en expérimentation animale. Nous présentons ici trois aspects traités au sein des projets SYSBIOX et  $\mu$ HepaReTox : la caractérisation du comportement cellulaire, l'évaluation de la toxicité de xénobiotiques par des techniques Omiques et la détermination du métabolisme de xénobiotiques au sein des biopuces.

## Caractérisation du métabolisme cellulaire dans les biopuces

Des techniques de métabolomique ont été développées pour décrire et comprendre le métabolisme cellulaire basal dans les biopuces **Figure 1**. Des analyses statistiques multidimensionnelles dites supervisées ont été mises en place afin de caractériser la signature métabolique d'une culture en biopuce. En particulier, nos analyses ont montré une signature métabolique endogène des biopuces directement reliée aux conditions de culture, ainsi qu'une ségrégation claire entre les signatures métaboliques des biopuces hépatiques, rénales et de coculture foie-rein. Une signature métabolique unique a donc été obtenue démontrant la présence d'un métabolisme endogène spécifique à chaque type de biopuce, directement relié à la fonction physiologique de cet organe dans l'organisme **[A]**.

En complément des analyses de métabolomique, nous avons proposé une modélisation mécanistique du métabolisme cellulaire en combinant la métabolomique-sur-puce et l'analyse des flux métaboliques **Figure 2**. Nos résultats montrent que la biopuce hépatique et la boîte de Pétri présentent des activités glycolytiques similaires et caractéristiques d'un environnement limité en oxygène. Cependant, ces activités sont significativement plus élevées en biopuce, ce qui suggère un meilleur approvisionnement en oxygène. Ces résultats ont été validés par des analyses de transcriptomique **[B]**.

## Identification des perturbations métaboliques endogènes liées à la présence de xénobiotiques

Plusieurs xénobiotiques de référence tels que l'ammoniaque, le diméthylsulfoxyde, l'acétaminophène, l'ifosfamide et la flutamide ont été testés sur des biopuces hépatiques à différentes concentrations afin d'identifier des perturbations métaboliques endogènes liées à leur présence **[C, A, E]**. ➤

## Références

**[A]** Shintu L., Baudoin R., Navratil V., Prot J.-M., Pontoizeau C., Defernez M., Blaise B. J., Domange C., Pery A. R., Toulhoat P., Legallais C., Brochot C., Leclerc E., Dumas M. E. *Metabolomics-on-a-Chip and Predictive Systems Toxicology in Microfluidic Bioartificial Organs*. Analytical Chemistry, 2012, 84, pp. 1840-1848.

**[B]** Ouattara D. A., Prot J.-M., Bunescu A., Dumas M. E., Elena-Herrmann B., Leclerc E., Brochot C. *Metabolomics-on-a-chip and metabolic flux analysis for label-free modeling of the internal metabolism of HepG2/C3A cells*. Molecular Biosystems, 2012, 8, pp. 1908-1920.

**[C]** Choucha-Snouber L., Aninat C., Griscot L., Madalinski G., Brochot C., Poleni P. E., Razan F., Guillouzo C. G., Legallais C.,

Corlu A., Leclerc E. *Investigation of ifosfamide nephrotoxicity induced in a liver-kidney co-culture biochip*. Biotechnology and Bioengineering, 2013, 110, pp. 597-608.

**[D]** Prot J.-M., Bunescu A., Elena-Herrmann B., Aninat C., Snouber L. C., Griscot L., Razan F., Bois F. Y., Legallais C., Brochot C., Corlu A., Dumas M. E., Leclerc E. *Predictive toxicology using systemic biology and liver microfluidic "on chip" approaches: Application to acetaminophen injury*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2012, 259, pp. 270-280.

**[E]** Snouber L. C., Bunescu A., Naudot M., Legallais C., Brochot C., Dumas M. E., Elena-Herrmann B., Leclerc E. *Metabolomics-on-a-chip of hepatotoxicity induced by anticancer drug*

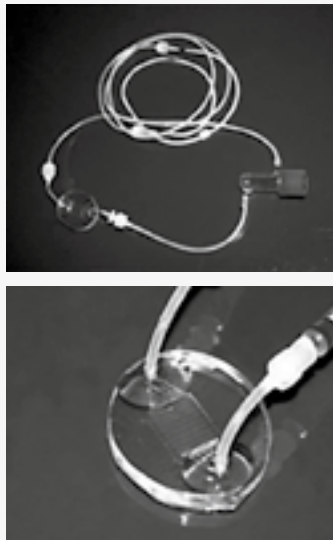
*flutamide and its active metabolite hydroxyflutamide using HepG2/C3a microfluidic biochips*. Toxicol. Sci, 2013, 132, pp. 8-20.

**[F]** Baudoin R., Prot J.-M., Nicolas G., Brocheton J., Brochot C., Legallais C., Benech H., Leclerc E. *Evaluation of seven drug metabolisms and clearances by cryopreserved human primary hepatocytes cultivated in microfluidic biochips*. Xenobiotica, 2013, 43, pp. 140-152.

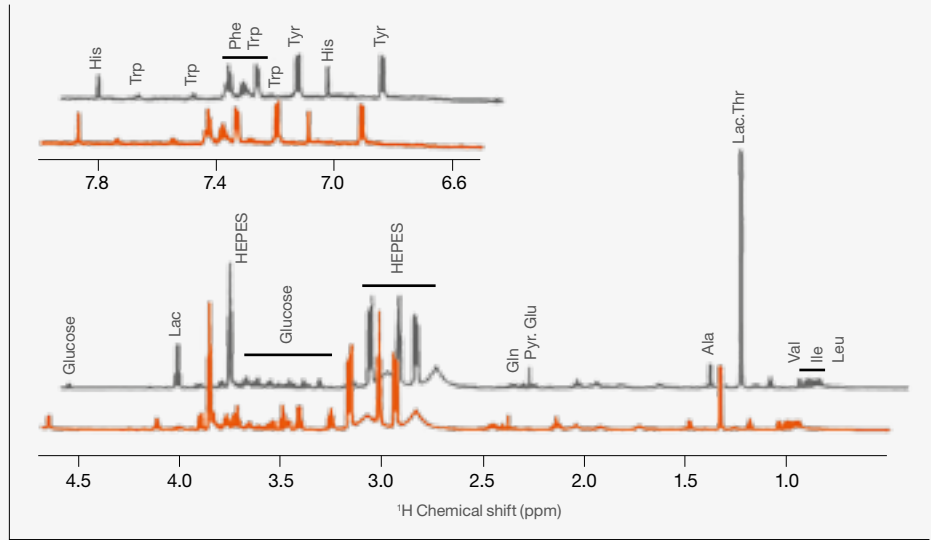
Prot J.-M., Videau O., Brochot C., Legallais C., Benech H., Leclerc E. *A cocktail of metabolic probes demonstrates the relevance of primary human hepatocyte cultures in a microfluidic biochip for pharmaceutical drug screening*. International Journal of Pharmaceutics, 2011, 408, pp. 67-75.

**Figure 1**

Métabolomique-sur-biopuce (panel de gauche: biopuce hépatique; panel de droite: spectre RMN).



Microfluidic biochip



<sup>1</sup>H NMR spectroscopy

**Figure 2**

Réseau métabolique intracellulaire d'un hépatocyte.

Cell metabolic network  
Glycolysis, PP pathway, β-oxidation  
TCA cycle, Urea cycle, Glycogenesis





➔ Nos analyses ont mis en évidence une réponse métabolique unique et caractéristique de chaque molécule ainsi qu'une relation quantitative de dose-effet. Pour l'acétaminophène, l'intégration des profils métabolomiques, transcriptomiques et protéomiques a permis une reconstruction des voies spécifiques de toxicité [D].

#### Développement de modèles cinétiques pour les biopuces

Un cadre de modélisation a été proposé pour évaluer la clairance hépatique à partir du suivi temporel des concentrations de xénobiotiques dans la biopuce hépatique. Ce cadre intègre: 1) un modèle de cinétique décrivant le dispositif *in vitro*; 2) un modèle statistique liant la cinétique et les concentrations mesurées dans le milieu de culture; 3) un modèle permettant d'extrapoler la clairance (*i.e.*, la vitesse de disparition) *in vitro* à une clairance hépatique *in vivo* chez l'humain.

L'approche a été appliquée à plusieurs molécules thérapeutiques pour estimer la clairance de la molécule parente et les vitesses d'apparition des métabolites [F]. Les résultats montrent que le métabolisme hépatique est sous-prédict avec les biopuces et que des ajustements au niveau des matériaux (liaison non spécifique) sont nécessaires avant d'envisager l'utilisation de cette approche en tant que méthode alternative.

#### Conclusion

Les travaux menés ont démontré qu'un environnement microfluidique améliore l'oxygénation des cellules et l'utilisation de l'oxygène, favorisant ainsi la production d'énergie. Les biopuces associées à l'analyse métabolomique, l'analyse des flux métaboliques et des données issues d'autres technologies "omiques" peuvent être avantageusement intégrées pour améliorer notre compréhension du fonctionnement des cellules dans des milieux de culture *in vitro* et identifier des signatures métaboliques spécifiques aux molécules. Les travaux démontrent le caractère prédictif et le potentiel de cette approche en tant que test *in vitro/in silico* alternatif aux expérimentations animales.

#### Remerciements

Les projets SYSBIOX et  $\mu$ HepaReTox ont bénéficié de financements de l'Agence nationale de la recherche, respectivement dans les thèmes « Chimie et procédés pour le développement durable » et « Physique et chimie du vivant ».

#### Collaborations

UMR CNRS 6600 Biomécanique et génie biomédical de l'Université de technologie de Compiègne (UTC).

Université Claude-Bernard, Lyon 1, Institut des sciences analytiques, Centre européen de RMN à très hauts champs (UMR 5280).

Inserm, UMR 991 Foie, métabolismes et cancer de l'Université Rennes 1, CHU de Pontchaillou.

CNRS-UMR 8089, SATIE/BIOMIS, École normale supérieure de Cachan-Bretagne.

#### ABSTRACT

Besides traditional *in vitro* systems such as plates or Petri dishes, microfluidic biochips have recently gained a remarkable interest. These *in vitro* systems aim at providing cellular environments close to *in vivo* conditions to reproduce reliably *in vivo* mechanisms or metabolic processes. In the framework of the SYSBIOX and  $\mu$ HepaReTox projects, we proposed to evaluate the toxicity and metabolism of xenobiotics in microfluidic biochips in order to assess the relevance of such

systems for applications in toxicology and pharmacology. One of the major results was the development of the metabolomics-on-chip approach. By combining the latter with the modeling of the intracellular metabolic network, we demonstrated that a microfluidic environment improves cell oxygenation. Our results indicated that the metabolic signature is unique to each biochip (liver, kidney or co-culture) demonstrating the presence of a specific endogenous metabolism directly related to the physiological function of the organ. In the presence of xenobiotics, a unique metabolic response, characteristic of each xenobiotic, is obtained in the hepatic biochip.