

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES

ECOLE DOCTORALE N° 605

*Biologie Santé*

Spécialité : Cancérologie

Par

**Aurélie LOUSSOUARN**

**Evaluation des effets et du devenir de xénobiotiques dans un contexte d'administration orale par l'utilisation de méthodes alternatives *in vitro*.**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 16 décembre 2021

Unité de recherche : INSERM U1232, CRCINA

## Rapporteurs avant soutenance :

Catherine MOALI  
Pierre PEYRET

Directrice de Recherche, CNRS – UMR 5305, Université de Lyon  
Professeur des universités, INRAE – UMR 454, Université de Clermont Auvergne

## Composition du Jury :

Président : Fabrice FLEURY Professeur des universités, CNRS – UFIP 6286, Université de Nantes  
Examineur : Audrey FERRAND Chargée de Recherche, INSERM – IRSD U1220, Université de Toulouse

Dir. de thèse : Axelle RENODON-CORNIERE Chargée de Recherche, CNRS – CRCINA U1232, Université de Nantes

Co-enc. de thèse : Maxime MAHE Chargé de Recherche, INSERM – TENS U1235, Université de Nantes



# Contexte Général de la Thèse

Cette thèse a été effectuée dans le cadre d'un Consortium Régional nommé MiBioGate porté par le Docteur Michel Neunlist et piloté par Carine Gimbert. La thèse est le fruit d'un travail dirigé par le Docteur Axelle Renodon-Cornière (CRCINA) et co-encadré par le Docteur Maxime Mahé (TENS), permettant la collaboration des deux laboratoires de recherche INSERM UMR 1232 CRCINA et UMR 1235 TENS. Ce travail a été réalisé à l'Université de Nantes, dans 2 équipes différentes du CRCINA. D'une part dans l'équipe 13 « oncologie nucléaire » à l'Institut de Recherche en Santé (IRS-UN) et d'autre part dans l'équipe 9 « apoptose et progression tumorale » au Laboratoire de Biologie des Cancers et de Théranostic (LabCT) situé sur le site René Gauducheau de l'Institut de cancérologie de l'Ouest (ICO). C'est suite à un changement de laboratoire en cours de ma thèse que la thématique a évolué, passant de l'étude de l'administration orale d'une protéine alternative aux anticorps à l'évaluation des effets d'herbicides sur la barrière intestinale.

Les figures ont été réalisées avec la licence BioRender.



# Remerciements

En premier lieu, je remercie **Marc GREGOIRE** pour m'avoir accueillie au sein du CRCINA. J'exprime aussi toute ma gratitude à la région Pays De la Loire, pour avoir financé ces trois années de thèse.

Je suis très reconnaissante envers **Catherine MOALI** et **Pierre PEYRET** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je pense aussi à **Audrey FERRAND** et **Fabrice FLEURY** qui complètent ce jury. Je suis particulièrement touchée d'avoir à mes côtés deux professeurs de mon parcours Universitaire pour évaluer mes travaux de thèse. Monsieur PEYRET vous représentez le début de mon aventure vers la recherche depuis mon DUT Analyses Biologiques et Biochimiques. Vous étiez déjà, sans le savoir, en train de me mener vers la barrière intestinale. Monsieur FLEURY, sans compter avoir été mon enseignant en Master 1, je vous ai également retrouvé dans mon jury de Master 2, c'est donc naturel d'avoir pensé à vous comme président de jury de thèse pour ainsi « boucler la boucle ».

Un très grand merci aussi à Elena **ISHOW** et Latifa **RBAH-VIDAL**, pour leurs conseils et leur écoute lors des comités de suivi de thèse. J'ai eu la chance de pouvoir échanger longuement, et avec grande qualité, avec vous deux en dehors de ces rendez-vous annuels et vos sourires et encouragements ont été pour moi une source de motivation.

Je remercie **Michel CHEREL** de m'avoir en premier accueillie au sein de l'équipe 13 qu'il dirige. Dans cette équipe, j'ai une pensée toute particulière pour Ghislaine **BEHAR** qui nous a quittés durablement, tu étais le ciment du groupe constitué par Frédéric **PECORARI** et Barbara **MOURATOU**. Je n'oublie aucun des doctorants de l'équipe 13 avec qui j'ai pu manger les midis ou discuter dans le Tram nous conduisant à l'IRS-UN (**Petar, Marisa, ...**).

Je remercie **François VALLETTE** en tant que responsable de l'équipe 9 de m'avoir donné une équipe pour poursuivre mes travaux. Merci Lisa **OLIVER**, de m'avoir transmis une partie de tes connaissances pratiques et théoriques sur le glioblastome et la culture de cellules primaires en 3D, j'espère que tu auras eu plaisir à travailler avec moi durant les 2 mois précédant la pandémie. Merci à Christophe **OLIVIER** pour ses conseils sur les polluants. C'est le moment pour moi de dire merci aux deux étudiants qui m'ont vue courir entre l'IRS-UN et la faculté de médecine et qui se sont adaptés à tous les changements de planning de réservation des PSM, merci **Lucie** et **Yoann** de m'avoir permis d'être à deux endroits en même temps.

Je suis reconnaissante à Michel **NEUNLIST**, directeur d'unité TENS, d'avoir accepté d'inclure ma thèse dans le Consortium MibioGate. J'en profite pour dire merci à tous les acteurs qui ont participé de près ou de loin à l'accomplissement de cette thèse : Malvyne **ROLLI-DERKINDEREN**, Patricia **PARNET**, Marie **BODINIER**, Grégory **BOUCHAUD**, Ramaroson **ANDRIANTSITOHAINA**, Samuel **CHAFFRON** et tous les autres. Je ne peux pas parler de

MibioGate sans remercier celle qui a fédéré l'ensemble des acteurs du consortium, organisé les congrès et séminaires sur la thématique des barrières et du microbiote, Carine **GIMBERT**. Carine, tu fais partie de celles sans qui rien n'aurait été possible. L'histoire commence par des ressemblances, nous sommes toutes les deux venues depuis une terre merveilleuse : l'Auvergne, nous avons réalisé le même DUT dans la même ville (bon pas la même année), et voilà qu'en cherchant un stage, je tombe sur des offres de thèses que tu publiais... Et parce que c'est particulièrement drôle cette façon qu'a la vie de nous mettre sur la route de personnes, tu salueras ton petit frère avec qui j'ai partagé une partie du collège. Merci à toute l'équipe TENS de m'avoir accueillie, bien que cela ait été pour une courte période. Merci en particulier à Philippe **AUBERT** pour ses conseils sur les Caco-2, à Tony **DURAND**, Killian **HILLION** et Thibault **OULLIER** de m'avoir aidée à prendre quelques marques dans le laboratoire. MibioGate c'est aussi vous quatre, **Johanna**, **Amélie**, **Eléonore** et **Alexandre**. La pandémie ne nous a pas permis de nous retrouver aussi souvent que nous le voulions. Un merci aussi à **Clémence** pour ton travail qui a mis en valeurs nos thèses sous un format ludique et vulgarisé.

Je remercie ensuite et surtout Dominique **HEYMANN** de m'avoir accueillie dans l'équipe 9, au sein du LabCT installé dans les locaux de l'ICO. Ce fut une renaissance scientifique entourée de Denis **COCHONNEAU**, Emilie **MORANTON**, Vincent **POTIRON** et bien sûr de toi Javier **MUNOZ-GARCIA**. C'est encore moi ! Un anticorps le matin, une question le midi et encore un anticorps le soir ! Merci du fond du cœur pour ta disponibilité et TOUS tes conseils. Avant que l'équipe 9 ne disparaisse, je n'oublie pas les autres membres avec qui j'ai partagé des réunions scientifiques enrichissantes, des repas de détente (quand cela était encore possible) notamment **Pierre-François**, **Lisenn**, **Marie-Pierre**, **Gwennola** et **Shankar**. Bien que tu sois partie de Nantes pour rejoindre une équipe à Lille, merci à toi, Edith **BONNELYE** pour tes conseils et ta relecture du papier. Il me faut surtout remercier Nolwenn **DUBOIS**, pour son aide technique et sa chaleur humaine réconfortante. Ton arrivée sur le projet lors des derniers mois de thèse m'aura été d'une aide inestimable.

Je remercie Maxime **MAHE**, mon co-encadrant de thèse de ses conseils et de ses corrections précieuses sur le manuscrit. Je te remercie de m'avoir accueillie deux mois au sein de ton équipe pour en apprendre plus sur les organoïdes. Je te souhaite également toutes mes félicitations pour ce grand bonheur qui arrive dans ton foyer.

Et puis un grand merci à Axelle **RENODON-CORNIERE** ma directrice de thèse sans qui, rien n'aurait été possible. Notre entente a été immédiate dès mon entrée en stage de Master 2, et depuis je ne t'ai plus quittée ! D'abord la fac de médecine, puis le bâtiment de l'IRS-UN et enfin l'ICO. La thèse est une aventure que nous avons vécues à deux. Nous avons partagé beaucoup de moments forts et j'espère que ta première doctorante ne te dissuadera pas d'en prendre d'autres. Grâce à toi, j'ai pu grandir en tant que chercheur, tu m'as ouvert la voie à, je l'espère, une longue carrière dans la santé humaine. Merci surtout pour tes conseils et ton aide précieuse. Je suis plus que tout reconnaissante de l'investissement que tu as donné pour ma thèse, peu de directeurs sont aussi présents que tu as pu l'être. Si je ne devais rajouter

qu'un dernier message pour te remercier cela serait pour toutes tes touchantes attentions personnelles.

\*\*\*\*\*

En second lieu, je remercie chaleureusement Karine **BERNARDEAU**, de la plateforme de protéines recombinantes (P2R) et sa collaboratrice Klara **ECHASSERIEAU**, pour leur aide et m'avoir prêté la centrifugeuse. Je demande pardon à vos oreilles pour les nombreuses utilisations du sonicateur.

J'ai également un merci chaleureux à distribuer à la « Plateforme de Spectrométrie de Masse » de l'IRS-UN. Je m'adresse à toi Mikaël **CROYAL**, responsable de la plateforme, tu as su me transmettre ta passion pour la recherche scientifique et me donner l'envie de réaliser une thèse dès mon Master 1. J'ai eu l'occasion à de nombreuses reprises de te le dire, mais ici je le grave dans le marbre, MERCI. J'ai découvert grâce à toi ce que devrait être la science pour tout le monde, le partage des informations, l'exigence dans son travail, la résilience, l'optimiste et ce grain de folie propre aux chercheurs. Tu représentes le scientifique que je souhaite un jour devenir (s'il devient possible de t'égaliser ^^). Je souhaite remercier infiniment l'ensemble de l'équipe, et en particulier Stéphanie **CROSSOUARD** et Audrey **AGUESSE**, vous avez été des mamans de substitutions. Vous m'avez apporté tant que cela soit scientifiquement ou amicalement. Et parce que la science aurait été moins folle, je n'oublie pas **Manon, Valentin, Stéphane, Camilla, Luis** et **Zied** avec qui j'ai partagé de très bons moments.

D'autres personnes ont gravité autour de moi pendant cette thèse, m'apportant de la distraction quand j'en avais besoin, je pense au bureau de l'Association Nan'Thèse ADBS dont je suis fier de faire partie depuis sa création en 2020. Merci **Chloé, Céline, Constance, Chirine, Enora, Lisa, Florestan** et bien sûr merci à mes compatriotes du pôle communication (le meilleur de tous), **Milène** et **Morgane**, pour cette aventure mêlant science et convivialité ! Je pense aussi au service technique et à tous les stagiaires : **Elen, Raphaël, Louis, Mélina, Matisse** et **Maxime**.

Puisque la thèse est une aventure particulière, je me dois de remercier les personnes formidables qui m'ont entourée et épaulée, la fatigue m'enlaçant j'espère n'oublier personne.

\*\*\*\*\*

Que serait un laboratoire sans ses doctorants, qui apportent cris de joie à la réussite d'un western-blot, cris de désespoir à une bande qui n'apparaît plus ! Mais c'est avant tout des rires en tout temps et pour tout le monde. J'ai trouvé dans ce deuxième labo une famille et des amis fidèles. D'abord il y a les trois drôles de dames les docteurs Joséphine, Marie et Manon. **Joséphine** tu es pour nous toutes un modèle, la Queen Josy, j'espère que nous pourrons nous revoir prochainement. **Marie**, tu es ma future canadienne préférée, tes

imitations me manquent tellement ; il est impensable que tu partes sans que l'on se soit vu tu entends ?! **Manon**, la tornade du labo toujours disponible pour répondre à mes questions, passer un coup de main et résoudre les problèmes techniques, oui je peux le dire tu es un couteau suisse. Tu étais aussi ZE top model, je ne te l'ai pas dit, mais qu'est ce que je bavais sur tes tenues. Ton auréAIL ne résonne plus dans le labo. Puis, il y a toute la joyeuse clique. **Perrine**, quelle surprise de se retrouver dans le même labo après avoir partagé le même Master. Etre partagée entre deux laboratoires je sais à quel point cela peut être compliqué, et je te remercie de ta bienveillance. **Antoine** et **Antoine**, nous avons souvent échangé autour d'un café, et rien que pour ces moments je vous en remercie. **Alhem** malheureusement nous n'avons fait que nous croiser, je retiendrais néanmoins tes excellents dons de pâtissière. **Adrien**, merci pour ton calme, ta patience et ta sérénité, ils font de toi le maître yoda de ce bureau des étudiants. A croire que rien ne t'atteint, même pas tes déboires avec les voitures, je suis admirative. Merci à toi **Luc**, j'ai découvert récemment notre passion commune pour les fleurs et les roses ! Camille et Florestan merci d'avoir participé à mon bonheur quotidien au laboratoire, merci pour ces longgggggggues discussions scientifiques que nous avons eues. Je ne sais pas lequel de nous trois est le plus têtu ! Merci à vous tous pour les moments de partage autour d'une raclette ou d'une pizza.

**Camille**, je ne pourrais jamais assez te remercier pour tout le soutien que tu m'as procuré au labo dans les moments de doute. Je n'oublierais jamais nos repas du midi assises sur ton plaid dans la pelouse profitant d'un brin de soleil cuisant sur nos peaux diaphanes. Il n'y a pas meilleure personne forcément tu es fan d'Harry Potter. C'est à mon tour de t'encourager, de te montrer à quel point tu fais bien les choses et que ta thèse sera d'une grande qualité car je ne doute pas de toi un instant et **Emilien** (que je remercie également pour son humour, son soutien à chacune de nos retrouvailles et son aide scientifique) n'en est que plus convaincu, j'en suis sûre.

**Florestan**, dès ta première visite du labo nous sommes devenus amis. Une complicité naturelle nous a liés et grâce à toi ce fut un plaisir de venir chaque jour. Sans compter les parties de jeux de société, les promenades avec nos boules de poils, les anniversaires arrosés qu'est-ce que j'ai pu rire. Je pars le cœur moins lourd en sachant que je vais continuer de profiter de tes talents de pâtissier et de pizzaiolo. Tu es une belle personne et un super scientifique. Merci infiniment pour ton soutien sans faille à Thomas.

Je ne serai pas originale en disant que la thèse ce n'est pas que de la science, mais aussi une expérience de vie. C'est pour cela que je dois aussi remercier tous ceux qui ont été autour de moi pendant ces dernières années. Il y a ceux qui n'étaient pas loin comme les copains de l'Erdre, **Véro** et **Kiliann** (une amie chère, une seconde maman et surtout ma blonde préférée, j'ai hâte de me retrouver sur ton canapé pour échanger nos boulettes), **Benoit** et **Matthieu** (vous avez été de vraies bouffées d'oxygène avec les balades, vos récits de voyages et votre partage culinaire qui éveille les papilles). Et il y a ceux qui sont plus loin, mais à jamais dans mon cœur, **Mylène** et **Juan** vous avez su constituer une jolie famille de clowns toujours le bon mot pour me faire rire. Une autre jolie famille que j'ai eue le bonheur de voir se construire

durant ma thèse est celle de la famille Trouillet, **Caroline** mon amie d'enfance, quel bonheur de te voir épanouie, promis je vais avoir du temps pour venir te voir maintenant. **Megan** tu as été ma première amie dès mon arrivée à Nantes. Tu resteras mon binôme à vie, nous étions comme le ying et le yang un joli partage de chimie et de biologie sur les bancs de la fac et en dehors bien sûr. J'ai hâte de partager à nouveau des bons moments avec toi.

Aux petites têtes blondes (**Mélina, Nora et Noé**) qui je l'espère éprouverons le même amour que moi pour la Science. **Mélissa** ma filleule, par ces quelques mots je veux te dédicacer cette thèse. Tu évolues dans un monde de changement constant et tu as su t'adapter pour être la jolie petite fille que tu es. Garde ton espièglerie, ton sourire et développe tes 2 langues maternelles. Le partage est difficile avec l'arrivée de ton petit frère **Raphaël**, mais en donnant tu récupéreras le double (même les jouets cassés en 2, je parle d'expérience).

**Ludo** et **Loulou**, qu'aurait été ma thèse sans vous pour m'écouter et me reconforter d'autant plus que Ludo tu connais les joies d'une thèse pour en faire une toi aussi (une thèse édulcorée, mais une thèse quand même 😊). Franchement, j'aime lire à toute heure vos petites blagues, écouter vos coups de gueule et surtout nos retrouvailles (pense à prendre une veste Ludo).

A ma soeurette **Claire**, un brin de femme au dynamisme cosmique. Ton énergie tu me l'as transmise pour avancer même si tu t'es éloignée géographiquement à Tours puis en Vendée. Quel bonheur de te revoir chaque mois, je bénis l'Ordre des Vétérinaires d'avoir su dépêcher la pépite. Maintenant que la thèse se termine, nous allons pouvoir chevaucher ensemble vers les châteaux de la Loire, je tiendrais ma promesse.

**Merci à la ménagerie** : Mister Shasta, Mushu le demi-frère de Shasta, Mushu le frère adoptif de Shasta, Roquette et Freyja les shetland, Leia la cocker, Jaïna la finois de laponie, Cerise, Kiara, Paga et Jedi les bergers australiens, Miella et Miss Kiss les labradors, Shinny le corgi, Pablo, Black le braque, Falco le husky, sans oublier Dédé le cheval, Chateigne, Helios, Roméo et Albus les chats, Miss Teigne et Crispy les lapins. Et toi aussi Hermine le petit âne du Cotentin avec qui je joue comme une enfant.

Rassurez-vous seul Shasta est à moi !

Merci au **café** d'exister et dire que je te détestais avant ma thèse, les choses ont bien changé !

\*\*\*\*\*

Je terminerais par ma famille, les personnes de l'ombre qui sans s'en rendre compte ont joué un rôle prépondérant dans le bon déroulement de cette thèse.

A **Gaby** et **Jean-louis** mes extraordinaires anciens voisins qui sont comme des grands-parents pour moi et qui se sont toujours inquiétés de savoir comment nous allions.

A **Stéphanie, Amélie et Juliette**, pour votre joie de vivre et leur foie gras, canard et autres délices corrézien.

A ma belle famille, **Isabelle et Jean-Louis**, pour m'avoir accueillie dans leur foyer comme un de leurs enfants. Je vous remercie d'avoir aussi bien pris soin de Thomas. A **Yvonne et Louis**, d'être toujours aussi compréhensifs et patients alors que nous savons à quel point nous sommes loin. A mon beau-frère et ma belle-sœur **Nicolas et Adeline** de leur franche camaraderie et de me rappeler que la vie c'est aussi autre chose que la thèse.

A mes grands-parents, mes oncles et tantes, cousins et cousines. Merci en particulier à ma mamie **Marcelle** et à mon papi **Jacques** de nous permettre de nous évader le temps d'un dimanche pour refaire le monde et manger de bons légumes. Je fais une spéciale dédicace à **Patricia et Richard** qui nous redonnent le peps avec leur dynamisme et leur joie de vivre. J'ai une pensée pour ma petite mamie **Jocelyne** et ma tatie **Béa**.

A mes sœurs **Eloïse, Odeline**, et mes formidables parents qui ont m'ont toujours apporté l'aide et le réconfort depuis mon entrée dans les études supérieures. Papa, Maman, j'ai dû rapidement prendre mon envol à 8 000km de vous, mais grâce à vos enseignements j'ai pu devenir la femme forte et indépendante que je suis aujourd'hui. **Maman**, je suis si heureuse de pouvoir partager des moments avec toi, merci de t'inquiéter pour ma santé et de m'avoir donné ta créativité et ton goût pour la biologie. **Papa**, je te remercie pour ton affection inépuisable, ton soutien de chaque instant. Tu es mon modèle de résilience, d'abnégation et de courage. Je m'applique chaque jour à te ressembler pour affronter les obstacles et toujours me relever en gardant le sourire.

**Shasta**, ma peluche préférée, ma petite boule de poils comment aurais-je pu faire cette thèse sans toi, tes calins et facéties ? Je te demande pardon pour ces 3 derniers mois où tes balades se sont raccourcies.

Il y a des personnes dans une vie qui chamboulent tout. Mes mots ne seront jamais à la hauteur de l'amour et de l'affection que tu m'as témoignée tout au long de ces 8 années. **Thomas**, mon aimé, en plus de faire battre mon cœur, tu as toujours été à mes côtés durant les moments difficiles et heureux (il y en a eu bien plus). J'ai trouvé en toi mon alter ego. La réussite de ces trois années n'aurait pas été possible sans toi. Nous avons tant refait le monde qu'il doit être carré maintenant. Merci de ta patience (quand un travail de 1h se transforme en 3h), merci pour ton humour (qu'est-ce qui est petit, jaune et bleu ?), merci pour ta simplicité et ton sourire. Un si grand merci pour les échanges scientifiques de haut vol, nous mériterions un prix Nobel pour nos inventions farfelues. Je terminerais mes remerciements pour toi mon chéri en empruntant les mots de Marcel Proust : « soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries ».

# Liste des abréviations

## A

---

AA	Acides Aminés
AcM	Anticorps Monoclonaux
ADCC	Cytotoxicité à médiation Cellulaire Dépendante des Anticorps
ADN	Adenosine Diphosphate
ADEME	Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie
AFA	Association François Aupetit
ALCL	Alachlore
AMPA	Acide amino-méthyl-phosphonique
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ARS	Agence Régionale de santé
ATP	Adénosine Triphosphate
Atz	Atrazine

## B

---

BCA	Acide bicinchoninique
BHE	Barrière Hémato Encéphalique
BSA	Sérum de veau fœtal (Bovin serum albumine)

## C

---

CA	Cocktail: Atz + DEA + DIA + DEDIA
Caco-2	Cellules d'adénocarcinome de côlon humain
CCK	Cholécystokinine
CCR	Cancer Colorectal
CD	Dichroïsme Circulaire (Circular Dichroism)
CDR	Région Déterminant la Complémentarité
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
CL	Claudine
CL50	Concentration Létale 50
CM	Cocktail : Mtc + ESA + OXA
Crb	Crumb
CRCINA	Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes Angers
CSI	Cellules Souches Intestinales
CT	Cocktail total: Mtc + ESA + OXA + Atz + DEA + DIA + DEDIA

## D

---

Da	Daltons
DAPI	4'-6-diamidino-2-phénylindole dihydrochloride
DEA	Déséthyl-Atrazine
DEDIA	Déséthyl-Déisopropyl-Atrazine
DGM	Modèle Gastrique Dynamique
DIA	Déisopropyl-Atrazine
DOL	Degrés de marquage
DTT	Dichlorodiphényltrichloroéthane

## E

---

E-cad	E-cadhérine
ECS	Cellules Souches Embryonnaires
EDCH	Eaux destinées à la consommation humaine
ELISA	Test immuno-enzymatique (« Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay »)
Em	Emission

EMA	Agence Européenne des Médicaments
EPA	Agence de protection environnementale
EpCAM	Molécule d'Adhésion des Cellules Epithéliales
ESA	Acide Ethane-Sulfonique du métolachlore
Ex	Excitation

## F, G

---

FaSSGF	Milieu synthétique gastrique à jeun
FaSSIF	Milieu synthétique intestinal à jeun
FDA	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux
FeSSIF	Milieu synthétique intestinal post-prandiale
FeSSGF	Milieu synthétique gastrique post-prandiale
FITC	Isothiocyanate Fluorescéine

## H

---

HCl	Acide Chlorhydrique
HGS	Modèle de Simulation Gastrique humaine
HIEC	Cellules Epithéliales Intestinales Humaines
HRP	Horse Radish Peroxydase
HSF	Facteur de transcription de choc thermique
HT-29-MTX	Cellules d'adénocarcinome de côlon humain activées au méthotrexate
HyA	2-Hydroxyatrazine

## I, J

---

IL	Interleukine
Ig	Immunoglobuline
iPCS	Induction des Cellules Souches Pluripotentes
JA	Jonction Adhérente
JAM	Molécules Jonctionnelles d'Adhésion

## K, L

---

LC	Chromatographie Liquide
LPL	Lipoprotéine lipase
LPS	lipopolysaccharide
LY	Lucifer Yellow

## M, N

---

MAPK	Protéines kinases activées par les mitogènes
MDCK	Cellules de rein canin Madin-Darby
Mdeg	Millidegrés
MICI	Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin
MUC	Mucine
MS	Spectrométrie de Masse
Mtc	Métolachlore
MTT	Méthyle Thiazol Tetrazolium
Nb	Nanobodies

## O

---

OCLN	Occludine
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OPD	O-Phenylenediamine Dihydrochloride
OXA	Acide OXanilique du métolachlore

## P, Q, R

---

PBS	Tampon Phosphate Salin
POA	Procédés d'Oxydation Avancée
PFA	Paraformaldéhyde
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
RE	Réticulum Endoplasmique
ROS	Espèces Réactives de l'Oxygène

## S

---

ScoF	Milieu synthétique du côlon
SDS	Sodium DodécylSulfate
SNA	Système Nerveux Autonome
SNE	Système Nerveux Entérique
SNP	Système Nerveux Parasympathique
SNS	Système Nerveux Sympathique
SOD	Superoxyde Dismutase
SVF	Sérum de Veau Fœtal

## T, U

---

TBS-T	Tampon salin TRIS- Tween
TC	Taurocholate de sodium
TENS	Le Système Nerveux Entérique dans les Troubles intestinaux et cérébraux
TEER	Résistance Electrique Transépithéliale
TGF	Facteur de Croissance Transformant
TIM	Modèle dynamique multi-compartmental
TJ	Jonction Serrée (« tight junction »)
TNF	Facteur de Nécrose Tumorale
UPR	Réponse aux protéines non repliées
UV	UltraViolet

## V, W, X, Y et Z

---

WHO	Organisation Mondiale de la Santé (World Health Organization)
ZO	Zonula Occludens



# Table des matières

<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>1</b>
<b>PARTIE 1 : BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>3</b>
<b>Chapitre 1 : La circulation des xénobiotiques dans notre organisme</b>	<b>4</b>
<b>1. Suivi du devenir d'un xénobiotique</b>	<b>4</b>
1.1. L'absorption	4
1.2. La distribution	6
1.3. La métabolisation	6
1.4. L'élimination	7
<b>2. Le système digestif</b>	<b>8</b>
2.1. Les fonctions du système digestif	8
2.2. Le microbiote intestinal	12
2.2.1. Le rôle du microbiote intestinal dans le système digestif	12
2.2.2. Le dialogue entre l'hôte et le microbiote	15
2.2.3. La modulation du microbiote	17
2.2.4. Interaction du microbiote avec les xénobiotiques	18
<b>3. Les barrières biologiques : une protection suffisante contre les xénobiotiques ?</b>	<b>19</b>
3.1. Rôles et structure des barrières biologiques	19
3.2. La barrière intestinale	21
3.3. La perméabilité de la barrière	24
3.3.1. Les voies de perméabilité	24
3.3.2. Les jonctions cellulaires	27
3.4. Le stress et la barrière intestinale	34
3.4.1. Les mécanismes de protection cellulaires	34
3.4.2. Les altérations de la perméabilité intestinale	38
<b>Chapitre 2 : Qui sont ces xénobiotiques ?</b>	<b>42</b>
<b>1. Les médicaments : ces xénobiotiques volontairement assimilés</b>	<b>42</b>
1.1. Les molécules conventionnelles	42
1.1.1. Les petites molécules chimiques	42
1.1.2. Les Anticorps	43
1.2. Les protéines thérapeutiques alternatives	47
1.2.1. Les fragments d'anticorps	47

1.2.2.	Les nanobodies _____	48
1.2.3.	Les protéines d'échafaudages _____	49
1.2.4.	Les affinités comme outils diagnostique et thérapeutique _____	54
<b>2.</b>	<b>Les polluants : ces xénobiotiques cachés que nous consommons _____</b>	<b>58</b>
2.1.	Une diversité de polluant à l'origine d'une toxicité environnementale _____	58
2.1.1.	Les sources de pollutions _____	58
2.1.2.	Classification des polluants _____	59
2.2.	Les Herbicides _____	63
2.2.1.	Réglementation _____	63
2.2.2.	Les voies de transfert _____	64
2.3.	La surveillance et contrôle de la pollution _____	66
2.3.1.	Les indicateurs de qualité _____	66
2.3.2.	Analyse et traitement des eaux _____	67
2.3.3.	Processus de dégradation des herbicides _____	70
2.4.	L'exposition aux polluants et à leurs métabolites _____	73
2.4.1.	Analyses des eaux de surfaces et souterraines _____	73
2.4.2.	Analyse de l'eau de consommation humaine _____	75
2.5.	Les effets des triazines et des chloroacétamides _____	78
2.5.1.	L'atrazine _____	79
2.5.2.	Le métolachlore _____	81
	<b>Chapitre 3 : Comment étudier les effets de ces xénobiotiques ? _____</b>	<b>85</b>
<b>1.</b>	<b>Les modèles développés pour l'étude de la stabilité gastro-intestinale d'un xénobiotique _____</b>	<b>85</b>
1.1.	Les modèles statiques _____	86
1.2.	Les modèles dynamiques _____	88
<b>2.</b>	<b>Les outils permettant l'administration orale des protéines thérapeutiques _____</b>	<b>90</b>
2.1.	Les approches facilitant l'administration orale d'un xénobiotique _____	90
2.2.	L'ingénierie protéique _____	92
2.2.1.	Exploration de la diversité naturelle _____	92
2.2.2.	La mutagenèse dirigée _____	93
2.2.3.	L'ingénierie rationnelle des protéines _____	94
<b>3.</b>	<b>Les modèles d'étude de la barrière intestinale _____</b>	<b>96</b>
3.1.	Etudes réglementaires _____	96
3.2.	Etudes conventionnelles _____	98
3.2.1.	Les études sur l'Homme _____	98
3.2.2.	Les modèles in vivo _____	99
3.2.3.	Les modèles ex vivo _____	100

3.3.	Les modèles alternatifs <i>in vitro</i>	101
3.4.	Les modèles alternatifs en 3D	106
3.4.1.	Les sphéroïdes	106
3.4.2.	Les organoïdes	107
3.4.3.	Les systèmes microphysiologiques	108
3.4.4.	Les bioréacteurs	110
3.5.	Les modèles alternatifs <i>in silico</i>	110
<b>Chapitre 4 : Objectif de la thèse</b>		<b>112</b>
<b>PARTIE 2 : MATERIELS ET METHODES</b>		<b>116</b>
<b>PARTIE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION</b>		<b>132</b>
<b>Chapitre 1 : Administration orale d'une protéine alternative aux anticorps</b>		<b>133</b>
<b>1.</b>	<b>Caractérisation du comportement de protéines d'affinité artificielle dans le système gastro-intestinal</b>	<b>133</b>
1.1.	Préambule	133
1.2.	Résultats	134
1.2.1.	Choix de la méthode de dosage et suivi des affitines	134
1.2.2.	Evaluation du transport des affitines sur la barrière intestinale	138
1.2.3.	Comportement des affitines dans un milieu synthétique gastrique et intestinal	141
1.3.	Discussion	146
<b>2.</b>	<b>Amélioration de la stabilité des affitines par ingénierie des protéines</b>	<b>151</b>
2.1.	Préambule	151
2.2.	Papier publié	152
<b>Chapitre 2 : Exposition orale des herbicides et de leurs métabolites</b>		<b>184</b>
<b>1.</b>	<b>Préambule</b>	<b>184</b>
<b>2.</b>	<b>Résultats</b>	<b>185</b>
2.1.	Caractérisation du modèle cellulaire	185
2.1.1.	Prolifération et adhésion cellulaires	185
2.1.2.	Formation de la perméabilité cellulaire	186
2.1.3.	Expression protéique des jonctions cellulaires	187
2.1.4.	Expression des gènes codant pour les protéines de jonction	189
2.2.	Evaluation des effets cellulaires des herbicides	190
2.2.1.	Viabilité cellulaire	190
2.2.2.	Prolifération et adhésion cellulaires	192
2.3.	Evaluation des effets des herbicides sur les jonctions cellulaires	195

2.3.1.	Evaluation de l'expression protéique	195
2.3.2.	Evaluation de l'expression génique	197
2.3.3.	Morphologie et distribution des protéines de jonctions	198
2.3.4.	Etude de la perméabilité cellulaire intestinale	201
2.4.	Etude des effets cocktails des herbicides	206
2.4.1.	Effets des cocktails sur les cellules Caco-2	207
2.4.2.	Effets des cocktails sur la perméabilité membranaire	209
2.4.3.	Effets des cocktails sur l'ensemble du génome	212
<b>3.</b>	<b>Discussion</b>	<b>216</b>
<b>PARTIE 4 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>		<b>224</b>
<b>REFERENCES</b>		<b>232</b>
<b>ANNEXES</b>		<b>278</b>

# Table des illustrations

## Liste des Figures

<u>Figure 1.</u> Les différentes voies d'entrée des xénobiotiques _____	5
<u>Figure 2.</u> Processus de dégradation des nutriments dans le système digestif _____	10
<u>Figure 3.</u> Distribution et fonctions du microbiote intestinal dans les différentes parties du tractus digestif. <i>Figure inspirée de Adak et Khan 2019.</i> _____	13
<u>Figure 4.</u> Arbre phylogénétique du domaine Bacteria englobant la diversité totale représentée par les génomes séquencés. <i>Figure de Hug et al. 2016.</i> _____	16
<u>Figure 5.</u> Structure et morphologie de la barrière intestinale _____	22
<u>Figure 6.</u> Dialogue entre le flux paracellulaire et le flux transcellulaire. <i>Figure inspirée de Turner et al. 2014</i> __	26
<u>Figure 7.</u> Organisation des jonctions cellulaires de la barrière intestinale _____	28
<u>Figure 8.</u> Production et élimination des ROS. <i>Figure inspirée de Djouadi et Lanez 2021</i> _____	35
<u>Figure 9.</u> Entre survie et mort cellulaire. Les mécanismes de protection face aux stress environnementaux __	36
<u>Figure 10.</u> Interaction entre l'épithélium intestinal et les composants non épithéliaux qui modulent la régénération. <i>Figure de Hageman et al. 2020</i> _____	38
<u>Figure 11.</u> Causes et conséquences de l'inflammation chronique de l'intestin _____	39
<u>Figure 12.</u> Structure et évolution des immunoglobulines. <i>Figure inspirée de G. Fan et Li 2018</i> _____	45
<u>Figure 13.</u> Activation du complément par la voie classique _____	46
<u>Figure 14.</u> Structure schématique des fragments d'anticorps et les effets sur la taille (kDa) et le temps de demi-vie biologique ( $t_{1/2}$ ). <i>Figure inspirée de Holliger et Hudson 2005</i> _____	48
<u>Figure 15.</u> Structure d'un anticorps humain et de camélidé _____	49
<u>Figure 16.</u> Représentation des protéines d'échafaudages impliquées dans le ciblage thérapeutique _____	50
<u>Figure 17.</u> Structure de l'affitine H4 avec l'hélice alpha en rouge et les 5 segments de feuillet bêta en magenta (Pymol) _____	54
<u>Figure 18.</u> Méthode de sélection <i>in vitro</i> par Ribosome Display _____	56
<u>Figure 19.</u> Les sources de pollution émises dans l'environnement _____	59
<u>Figure 20.</u> Processus de diffusion des polluants dans l'environnement. _____	65
<u>Figure 21.</u> Répartition géographique de la pollution des cours d'eau. <i>Carte de SOeS 2013</i> _____	66
<u>Figure 22.</u> Circuit de l'eau depuis la station de captage jusqu'aux réseaux de distribution domestiques _____	68
<u>Figure 23.</u> Biodégradation du diuron par des bactéries isolées du sol des cultures de canne à sucre. <i>Figure de Egea et al. 2017.</i> _____	70
<u>Figure 24.</u> Caractéristiques des métabolites du métolachlore _____	71
<u>Figure 25.</u> Dégradation de l'atrazine et formation de ses métabolites sous l'action de réactions d'hydrolyse, de photolyse et de réactions d'oxydo-réduction. <i>Figure de Kruger et al. 1993.</i> _____	72

<u>Figure 26.</u> Production des métabolites par ozonation de l'atrazine (Atz). <i>Figure de Avis de l'Anses, Saisine n° 2013-SA-0187</i>	73
<u>Figure 27.</u> Fréquence et quantification des polluants dans les eaux de surface et souterraines. <i>Figure de Baran et al. 2011.</i>	75
<u>Figure 28.</u> Carte des 24 stations de traitement de l'eau évaluée en Pays de la Loire. <i>Carte de Hub eau (EPTB Sèvre Nantaise)</i>	76
<u>Figure 29.</u> Qualité de l'eau en Région Pays de la Loire. <i>Figure de Hub eau EPTB Sèvre Nantaise</i>	77
<u>Figure 30.</u> Cinétique de dissipation de l'atrazine dans un champ et apparition des produits de transformation. <i>Figure de Barriuso et Koskinen 1996.</i>	80
<u>Figure 31.</u> Les différentes approches d'ingénierie protéique de la conception à la caractérisation de la protéine d'intérêt	95
<u>Figure 32.</u> Organisation d'une chambre d'Ussing. <i>Figure de Thomson et al. 2019.</i>	101
<u>Figure 33.</u> Représentation d'une monocouche cellulaire sur la technologie Transwell	104
<u>Figure 34.</u> Photo d'un sphéroïde réalisé au laboratoire.	106
<u>Figure 35.</u> Les différentes formes d'organoïdes intestinaux pour modéliser les fonctions de la barrière intestinale. <i>Figure de Nakamura 2019.</i>	108
<u>Figure 36.</u> Description du dispositif « organe-sur-puce ». <i>Figure de Tan et al. 2018.</i>	109
<u>Figure 37.</u> Méthode de quantification basée sur la spectrophotométrie	135
<u>Figure 38.</u> Méthodes de dosage basées sur la fluorimétrie	136
<u>Figure 39.</u> Méthode de suivi des affitines par western-blot.	138
<u>Figure 40.</u> Validation de l'innocuité des affitines H4, D1 et C3 pour les cellules intestinales	138
<u>Figure 41.</u> Evaluation de la perméabilité membranaire par mesure du TEER	139
<u>Figure 42.</u> Suivi des affitines au travers d'une monocouche épithéliale différenciée de Caco-2	140
<u>Figure 43.</u> Evaluation de la perméabilité membranaire après exposition aux affitines	140
<u>Figure 44.</u> Digestion des affitines, d'un nanobody et d'un anticorps dans un milieu synthétique gastrique	142
<u>Figure 45.</u> Résistance à la digestion gastrique de H4	143
<u>Figure 46.</u> Digestion des affitines dans un milieu synthétique intestinal	143
<u>Figure 47.</u> Interaction des affitines digérées et non digérées avec leur cible	145
<u>Figure 48.</u> Optimisation du gel de séparation SDS-PAGE	146
<u>Figure 49.</u> (Figure 1.) Proteolytic digestion of H4 by (A) Pepsin in FaSSGF or (B) pancreatin in FaSSIF.	155
<u>Figure 50.</u> (Figure 2.) Location of amino acids involved in pepsin digestion of H4 at pH 1.3.	156
<u>Figure 51.</u> (Figure 3.) Mass spectrometry analysis of undigested and digested H4.	157
<u>Figure 52.</u> (Figure 4.) Analysis of the pepsin digest of (A) H4 and mutants by tricine SDS-PAGE and (B) H4 and M1 by mass spectrometry.	160
<u>Figure 53.</u> (Figure 5.) Specific binding of H4 and mutants to lysozyme by ELISA.	161
<u>Figure 54.</u> (Figure 6.) Secondary structure of H4 and mutants by circular dichroism.	162
<u>Figure 55.</u> (Figure 7.) Thermostability of wild-type and mutated Affitins.	163
<u>Figure 56.</u> Caractéristiques cellulaires des cellules épithéliales intestinales	186

<u>Figure 57.</u> Formation de la barrière épithéliale en fonction de la lignée cellulaire _____	187
<u>Figure 58.</u> Expression des protéines de jonction en fonction de la lignée cellulaire _____	187
<u>Figure 59.</u> Optimisation des conditions d'extraction _____	189
<u>Figure 60.</u> Expression des gènes codant pour les protéines de jonction _____	190
<u>Figure 61.</u> Test ATP évaluant la viabilité cellulaire des Caco-2 exposées à des herbicides _____	191
<u>Figure 62.</u> Test MTT évaluant de la viabilité cellulaire des Caco-2 exposées à des herbicides. _____	191
<u>Figure 63.</u> Comparaison des effets des herbicides à 50 $\mu$ M sur la prolifération d'une monoculture Caco-2 et coculture Caco-2/HT-29 _____	193
<u>Figure 64.</u> Effet de la concentration en herbicides sur la prolifération cellulaire des Caco-2 _____	194
<u>Figure 65.</u> Comptage des noyaux marqués en immunofluorescence _____	195
<u>Figure 66.</u> Expression des protéines de jonction suite à une exposition aiguë et chronique aux herbicides ____	196
<u>Figure 67.</u> Expression des ARNm codants pour les protéines de jonction suite à une exposition chronique aux herbicides _____	197
<u>Figure 68.</u> Immunomarquage des protéines de jonction cellulaire _____	199
<u>Figure 69.</u> Immunomarquage du cytosquelette d'actine et de ZO-1 _____	200
<u>Figure 70.</u> Intégrité de la barrière intestinale après une exposition aiguë à faible et forte concentration en herbicides _____	201
<u>Figure 71.</u> Suivi de l'intégrité de la barrière au cours d'une exposition chronique de 21 jours à une gamme d'herbicides _____	202
<u>Figure 72.</u> Test de l'intégrité de la barrière épithéliale avec un marqueur paracellulaire _____	203
<u>Figure 73.</u> Evaluation de l'effet des herbicides à 10 $\mu$ M sur la voie paracellulaire _____	204
<u>Figure 74.</u> Evaluation de l'effet aiguë et chronique du Mtc et de l'Atz à faible concentration sur la voie paracellulaire _____	205
<u>Figure 75.</u> Passage du Mtc et de l'Atz au travers de la barrière intestinale _____	206
<u>Figure 76.</u> Viabilité cellulaire des cellules Caco-2 exposées à des cocktails de 0,5 $\mu$ M d'herbicides _____	207
<u>Figure 77.</u> Effet des cocktails sur l'expression des gènes codant pour les protéines de jonction _____	208
<u>Figure 78.</u> Effet des faibles concentrations en cocktails d'herbicides sur la prolifération cellulaire des Caco-2	208
<u>Figure 79.</u> Intégrité de la barrière après une exposition chronique aux cocktails d'herbicides _____	209
<u>Figure 80.</u> Impact des cocktails d'herbicides sur le passage de LY par la voie paracellulaire _____	210
<u>Figure 81.</u> Impact des cocktails d'herbicides sur le passage de F-AcS par la voie paracellulaire _____	211
<u>Figure 82.</u> Analyse en composantes principales des séries biologiques _____	212
<u>Figure 83.</u> Analyse différentielle des gènes par RNAseq _____	214
<u>Figure 84.</u> Heatmap des principaux gènes différentiellement exprimés entre les cellules non traitées et les cocktails _____	215

## Liste des Tableaux

---

<b>Tableau 1.</b> Caractéristiques de perméabilité aux ions des isoformes de claudines. <i>Tableau de Günzel et Yu 2013.</i>	30
<b>Tableau 2.</b> Résultats partiels de la campagne exceptionnelle ESOU métropole pour la détection de produits phytosanitaires et pharmaceutiques	74
<b>Tableau 3.</b> Résultats d'analyses (en µg/L) du captage et de l'UDI desservie à Saint-Gein 2013	78
<b>Tableau 4.</b> Métabolites de pesticides recherchés dans les eaux de source en bouteille commercialisées en 2014 par le laboratoire d'hydrologie de Nancy.	78
<b>Tableau 5.</b> Milieu mimant le fluide gastrique à jeun (FaSSGF) et postprandial (FeSSGF)	87
<b>Tableau 6.</b> Milieu mimant le fluide de l'intestin grêle à jeun (FaSSIF), postprandial (FeSSIF) et du côlon (ScoF)	88
<b>Tableau 7.</b> Différents paramètres testés pour réaliser un gel SDS-page plus résolutif	121
<b>Tableau 8.</b> Table 1 – Characteristics of wild-type and mutated H4	158
<b>Tableau 9.</b> Table 2 – Characteristics of wild-type and mutated C3.	164
<b>Tableau 10.</b> Concentration en protéine totale en fonction de la méthode d'extraction protéique.	188
<b>Tableau 11.</b> Comparaison des flux de F-AcS en fonction des conditions de traitement des cellules Caco-2.	212





# INTRODUCTION GENERALE

En biologie humaine, le concept de barrière a été appliqué pour des systèmes biologiques présentant plusieurs mécanismes de protection pour lutter contre les agressions extérieures : barrière cutanée, intestinale, pulmonaire, hémato-encéphalique, hépatique, etc. Lorsque ces barrières sont altérées elles peuvent être à l'origine de pathologies graves ou invalidantes. Les maladies touchant la barrière intestinale sont le plus souvent chroniques comme la maladie de Crohn, les rectocolites hémorragiques, les syndromes de l'intestin irritable ou les cancers colorectaux. D'après l'association François Aupetit (AFA), chaque année, 10 millions de personnes sont touchées de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin à travers le monde. L'identification précise des facteurs à l'origine d'une atteinte de la barrière intestinale reste irrésolue.

La notion d'exposome a émergé pour faire apparaître la complexité des facteurs environnementaux, en opposition aux facteurs génétiques, qui nous entourent. Cet exposome s'intéresse à la fois aux xénobiotiques (médicaments, polluants, etc.) ; aux éléments socio-environnementaux (niveau de vie, cadre urbain, etc.) et aux micro-organismes (virus, champignons, bactéries ou microbiotes d'organes). L'utilisation que nous faisons des xénobiotiques conduit à des rejets récurrents dans l'environnement. Certaines molécules telles que les pesticides, métaux lourds ou encore gaz chimiques se retrouvent dans l'air que nous respirons, l'eau que nous buvons ou les aliments que nous consommons. De plus, de nouvelles molécules sont mises sur le marché chaque jour. Que les molécules soient ingérées volontairement sous forme de traitement ou inconsciemment sous forme de résidus présents dans notre environnement, le challenge est alors de connaître leurs effets sur la santé à l'aide des méthodes les plus robustes et prédictives possibles. Alors que l'utilisation des animaux a longtemps été la référence pour étudier les effets toxicologiques des biomolécules, l'avènement du principe des 3R (Réduire, Raffiner et Remplacer) en 1959 avec Russel et Burch, favorise à présent les méthodes substitutives à l'expérimentation animale. L'évolution constante des modèles biologiques, et de la bio-informatique associée à l'essor des outils d'analyse plus performants offrent des perspectives prometteuses.

La question est alors de connaître les interactions de ces molécules, une fois assimilées, avec la barrière intestinale. Dans le cas des médicaments, nous savons que les molécules thérapeutiques doivent passer intactes et en quantité maximale au travers des barrières biologiques. Contrairement à une administration par injection intraveineuse, l'administration des molécules thérapeutiques par voie orale fait face à des contraintes biologiques qui affectent leur structure et leurs fonctions biochimiques. Dans le cas des polluants, nous souhaitons au contraire que l'interaction avec la barrière intestinale se fasse sans induire de modification délétère pour l'organisme.

**Objectif général** – L'objectif principal de ce travail est d'étudier les barrières biologiques sous le prisme des interactions avec les xénobiotiques. En combinant plusieurs méthodes expérimentales alternatives à l'utilisation des animaux, nous avons cherché à évaluer les effets de plusieurs molécules vis-à-vis des barrières biologiques qu'elles rencontrent. Parmi les xénobiotiques étudiés nous avons choisi 1) une protéine à visée thérapeutique et diagnostique nommée affitine qui pourrait être administrée par voie orale et qui par conséquent circulerait dans le tractus gastro-intestinal 2) des molécules chimiques aux propriétés phytosanitaires (herbicides) retrouvées dans l'eau de boisson destinée à la consommation humaine et qui, par conséquent circulent, elles aussi dans le tractus gastro-intestinal.

**Plan d'étude** – Ce manuscrit est organisé en quatre parties. La première partie consiste en une revue bibliographique détaillant les éléments abordés précédemment. Cette partie combine par chapitre les notions de barrières biologiques, de xénobiotiques et de modèles expérimentaux. Elle permettra de résumer et de rappeler les grandes lignes indispensables à la compréhension des différents travaux réalisés et exposés dans les parties suivantes. La deuxième partie décrira le matériel et les méthodes employés pour la réalisation des études expérimentales. La troisième partie, organisée en deux chapitres, permet de distinguer les résultats spécifiques aux deux xénobiotiques étudiés, et de discuter les principaux points soulevés dans ce manuscrit en regard de la littérature. La quatrième et dernière partie reprendra les résultats importants et conclura sur les méthodes de routines à mettre en place pour étudier les effets de xénobiotiques sur la barrière intestinale. Les perspectives qui découlent du projet de thèse seront également abordées.

# PARTIE 1 : BIBLIOGRAPHIE

\*\*\*

Les Xénobiotiques représentent toutes les substances au sein d'un organisme vivant qui lui sont étrangères : ils ne sont ni produits par l'organisme lui-même, ni contenus dans son alimentation. Le xénobiotique peut alors intervenir dans les processus biologiques d'un individu et conduire à une action sur l'organisme vivant qui le contient. Par exemple, en prenant un paracétamol pour soigner son mal de tête, un individu va sciemment prendre un xénobiotique pour que ce dernier agisse et produise un effet antalgique. Il en va de même lorsque ce même individu boit une gorgée d'eau provenant d'une rivière. Des xénobiotiques dont il n'a pas connaissance vont entrer dans son organisme et vont pouvoir agir sur différents paramètres physiologiques. Le devenir d'un médicament est un processus bien connu, si l'on considère que tous les xénobiotiques suivent le même schéma, comment circulent-ils ?

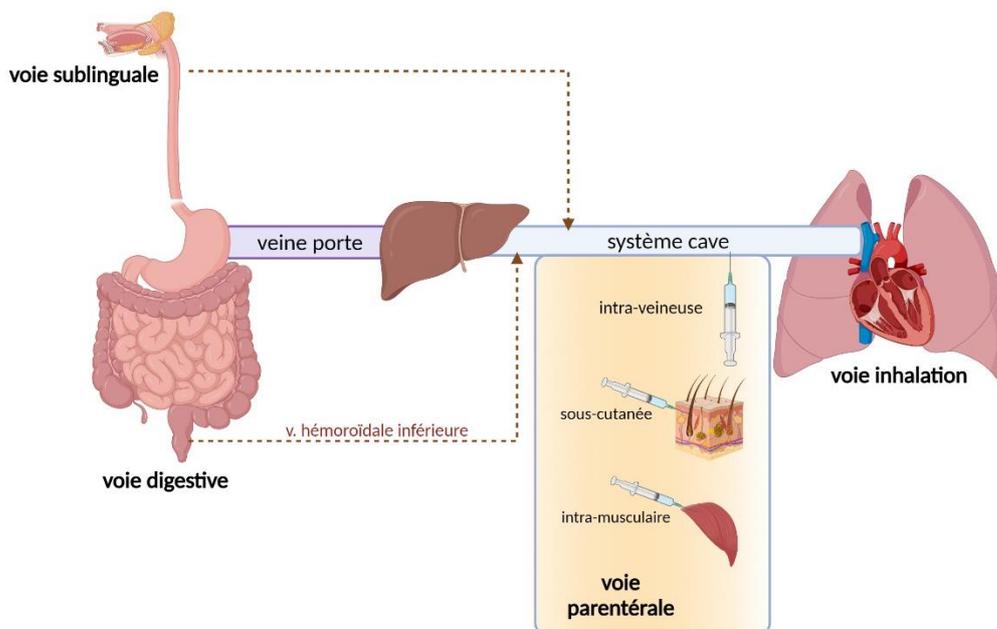
## **Chapitre 1 : La circulation des xénobiotiques dans notre organisme**

Le corps humain peut être apparenté à une succession de compartiments avec des organisations et fonctions distinctes. Chaque compartiment est délimité par une barrière biologique qui sert d'interface d'échange avec le milieu extérieur et favorise la protection des organes.

### **1. Suivi du devenir d'un xénobiotique**

#### **1.1. L'absorption**

Tous les médicaments destinés à avoir une action sur l'organisme passent dans la circulation sanguine. En revanche, tous les médicaments ne rentrent pas dans l'organisme par la même voie (Figure 1). Il en va de même pour les xénobiotiques. La première étape du devenir d'un xénobiotique passe par l'Absorption. Il s'agit du processus par lequel le médicament passe du site d'administration à la circulation générale. Les voies d'entrée pour les xénobiotiques sont nombreuses, les plus courantes sont liées à nos besoins vitaux avec la respiration (la voie d'inhalation) et l'alimentation (la voie orale aussi appelée digestive ou la voie sublinguale). D'autres peuvent être accidentelles lors de lésions (voie cutanée, sous-cutanée, musculaire) ou provoquées (voie rectale, voie parentérale). A chaque voie d'entrée correspond un compartiment.



**Figure 1.** Les différentes voies d'entrée des xénobiotiques

Le compartiment buccal est le lieu de 2 voies d'entrée potentielles : la voie digestive ou orale et la voie sublinguale. Contrairement à la voie orale qui présente une grande surface d'absorption, la voie sublinguale offre une absorption limitée mais cependant très rapide (N. R. Mathias et Hussain 2010). Une fois la paroi capillaire franchie, les xénobiotiques rejoignent directement la circulation générale. Dans le compartiment stomacal, le xénobiotique peut d'ores et déjà traverser la paroi de l'estomac pour rejoindre la circulation sanguine. Il peut aussi poursuivre son chemin dans l'intestin et/ou être dirigé via la veine porte hépatique vers le foie (Lowe et al. 2010). Dans le cas d'un passage par la veine porte hépatique, le xénobiotique, avant d'être distribué dans tout le corps pour y exercer son action, va passer par le foie et peut y être en partie transformé voire éliminé : il s'agit de l'effet de « premier passage hépatique ».

La voie parentérale regroupe toutes les injections (intraveineuse, intramusculaire ou sous-cutanée). Dans ce cas, le xénobiotique atteint la circulation sanguine directement et se répartit, sans subir l'effet de premier passage hépatique. La biodisponibilité du xénobiotique dépend de la vitesse d'action et/ou la quantité qui agit (ou les deux) (Hart, Barber, et Calvey 1975). L'absorption sera plus ou moins complète et plus ou moins rapide en fonction de ses propriétés physico-chimiques, car le xénobiotique peut très bien emprunter plusieurs voies pour rejoindre la circulation générale.

## **1.2. La distribution**

La distribution est la deuxième étape et correspond au processus de répartition du xénobiotique dans l'ensemble des tissus et des organes par le sang. Il est nécessaire de distinguer la phase plasmatique de la phase tissulaire (Dionigi et al. 2020) (Björkman 2002). Les hématies et les protéines circulantes (albumines, globulines, lipoprotéines) constituent le moyen de transport adéquat puisqu'il est possible de s'y fixer. Le xénobiotique, alors sous forme libre ou lié aux protéines, est en phase plasmatique. La fixation est à la fois variable d'un xénobiotique à l'autre, mais également réversible (Lapicque et al. 1986). La forme libre peut se diffuser à travers les barrières d'organes pour être métabolisée/éliminée. La forme liée, ne pouvant pas traverser les membranes, continue de circuler et peut agir comme réserve.

Plusieurs facteurs influencent la distribution et la diffusion du xénobiotique dans l'organisme. Les caractéristiques physico-chimiques du xénobiotique, et donc sa capacité à franchir les membranes vasculaires et cellulaires, vont jouer sur la biodisponibilité (Gleeson, Ryan, et Brayden 2016). L'état de santé de l'individu est un facteur important, en effet, l'âge, les pathologies préexistantes, l'irrigation des organes ou tissus et le débit sanguin vont faciliter la distribution des xénobiotiques dans la phase tissulaire.

C'est lors de l'étape de diffusion que l'on va pouvoir apprécier l'effet du xénobiotique. Cet effet est directement lié à sa capacité de liaison avec une cible ou un site d'action. Les sites d'actions sont multiples, si l'on reprend l'exemple des médicaments, nous retrouvons les récepteurs cellulaires ou nucléaires, les enzymes ou les protéines de transport qui permettent le transport des ions et de petites molécules à travers les membranes des cellules comme les pompes à protons, les agents pathogènes (virus, bactéries, champignons) (Gashaw et al. 2011). Le xénobiotique peut également intervenir par son interaction physico-chimique avec l'environnement du compartiment.

## **1.3. La métabolisation**

La biotransformation du xénobiotique conduit à sa dégradation progressive. La succession de réactions ou l'effet de métabolisation du xénobiotique a lieu principalement au niveau du foie et secondairement au niveau des reins et poumons. Il s'agit le plus souvent de réactions

enzymatiques conduisant à la formation d'une ou plusieurs entités appelées « métabolites » (Jancova, Anzenbacher, et Anzenbacherova 2010). À leur tour, ces métabolites peuvent être actifs, inactifs ou toxiques et donc conduire à des effets sur des cibles d'action. Le métabolisme s'effectue en deux phases. Une première phase regroupant un ensemble de réactions d'oxydation/réduction, de réactions chimiques d'hydroxylation par le cytochrome P450 (CYP450) et une seconde phase de conjugaison qui rend hydrosolubles les métabolites facilitant de cette manière leur élimination dans les urines ou la bile (Hao Sun et Scott 2010).

L'efficacité d'un médicament et la toxicité de celui-ci dépendent souvent des CYP450 présents dans l'organisme. Il existe des centaines de cytochromes. Les isoenzymes comme CYP1A2 qui biotransforment la caféine, la théophylline, le paracétamol, se distinguent des cytochromes tels que CYP2C9 qui, eux, biotransforment les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les anticoagulants et les hypertenseurs (Danielson 2002). Une variabilité de cette métabolisation existe entre les individus et chez un même individu au cours du temps.

#### **1.4. L'élimination**

La dernière étape du devenir du xénobiotique est l'élimination. Elle peut intervenir rapidement en quelques heures ou prendre beaucoup de temps. La finalité est l'élimination du xénobiotique de façon définitive de l'organisme par les urines ou d'autres voies secondaires comme la voie rénale, biliaire ou dans l'air expiré (Hosey, Broccatelli, et Benet 2014) (Bonate, Reith, et Weir 1998; Ibrahim et Garcia-Contreras 2013). D'autres voies d'excrétion sont possibles comme l'élimination dans le lait maternel ou la salive (Ito et Lee 2003).

Le phénomène d'élimination du xénobiotique soit sous forme inchangée soit sous forme de métabolite (inactif, actif ou toxique) après biotransformation est irréversible et très important pour éviter tout risque d'accumulation. Le manque d'excrétion d'un xénobiotique peut conduire à des effets toxiques au niveau hépatique ou rénal (Jones et al. 1993) (Pessayre et Benhamou 1979).

## **2. Le système digestif**

Le système digestif est le système de régulation directement au contact de notre environnement. Aussi les xénobiotiques, comme nous venons de le voir dans la première partie, vont entrer dans notre organisme et suivre divers circuits et modifications dans le but d'être éliminés. Dans cette partie, nous allons découvrir comment les xénobiotiques, une fois dans notre organisme, vont être modifiés par un des systèmes impliquant le plus grand nombre d'organes : le système digestif.

### **2.1. Les fonctions du système digestif**

Le système digestif est constitué de plusieurs organes principaux allant de la bouche au rectum (pharynx, œsophage, estomac, duodénum, jéjunum, iléon, appendice, côlon, rectum) et d'organes annexes au tube digestif, tels que les glandes salivaires, les dents, la langue, le foie, le pancréas ou la vésicule biliaire.

Les fonctions de ce système sont plurielles. Le système digestif intervient dans l'ingestion, la transformation et le transfert des aliments, médicaments ou toute substance dégradable. L'ingestion est le processus de dégradation qui facilite la séparation des résidus non digestibles par l'organisme facilitant de ce fait l'absorption vers le sang. Le processus de transformation peut être mécanique avec la mastication ou bien chimique grâce à la solubilisation de grosses molécules (Koppel, Maini Rekdal, et Balskus 2017). La digestion chimique conduit à la dégradation des lipides en acides gras, des glucides en unités monosaccharidiques et des protéines en acides aminés (AA) sous l'action d'enzymes de dégradation contenues dans la salive.

Le premier compartiment intervenant dans le système de digestion est la cavité buccale. Ce lieu de mastication permet le mélange du bol alimentaire aux amylases contenues dans la salive (Chauncey 1961). L'action des enzymes salivaires provoque dans un premier temps la dégradation de l'amidon et des glucides complexes en sous unités oligosaccharidiques (3 à 10 unités monosaccharidiques) ou disaccharidiques (lactose, maltose, sucrose).

Le second compartiment correspond à l'estomac. D'une taille pouvant accueillir de 50 mL lorsqu'il est vide à 1 L chez l'Homme, il est composé de 3 couches musculaires fortement vascularisées. Il a pour rôle le stockage des aliments et le broyage du bol alimentaire par

l'action conjointe des sucs gastriques et du pH acide. De puissantes contractions rythmiques et ondulantes autrement appelées péristaltisme produisent le chyme qui est évacué dans le duodénum par ouverture intermittente du pylore lors de la vidange gastrique (Lentle et de Loubens 2015). Lorsque le duodénum est rempli, un ralentissement de l'activité gastrique est opéré pour éviter une surcharge de l'intestin. L'estomac produit la gastrine, une hormone qui permet l'augmentation de la production d'acide chlorhydrique (HCl) qui tue la plupart des micro-organismes ingérés avec les aliments (Schubert et Rehfeld 2019). L'estomac sécrète également de la pepsine, une enzyme active à pH acide responsable de la dégradation des protéines en gros polypeptides (Schilling et al. 2018). Une modulation de la motricité stomacale s'effectue par une hormone gastro-intestinale : la motiline (Al-Missri et Jialal 2021). Ce polypeptide est sécrété par les cellules entérochromaffines et les cellules M de la muqueuse du duodénum (Diwakarla et al. 2017).. Lorsque le pH est basique, l'hormone inhibe la motricité de l'estomac alors qu'à l'inverse, elle a une action de stimulation lorsque le pH est acide. Elle jouerait un rôle de régulation entre deux repas.

Le troisième compartiment fait intervenir l'intestin grêle qui est composé du duodénum sur les 25 à 30 premiers centimètres puis du jéjunum et enfin de l'iléon. Il s'agit du lieu d'absorption privilégié des nutriments (AA, acides gras et glucides) grâce à l'organisation en plis, villosités et microvillosités qui augmente considérablement la surface d'échange (environ 200 à 250 m<sup>2</sup>) (Winne 1989). Le chyme nouvellement entré dans le duodénum va être une nouvelle fois dégradé par l'action de nombreuses enzymes (Figure 2).

Les enzymes des microvillosités (dextrinase, glucoamylase, lactase, maltase et sucrase) vont dégrader les disaccharides en monosaccharides (glucose, galactose, fructose) (Danielsen, Cowell, et Poulsen 1983). Les enzymes produites par le pancréas et déversées dans l'intestin grêle par le canal cholédoque au niveau du duodénum telles que la trypsine, chymotrypsine et carboxypeptidase vont dégrader les gros polypeptides en petits polypeptides ou peptides (Goldberg et Wormsley 1970). L'action des enzymes aminopeptidases, carboxypeptidases et dipeptidases provenant cette fois-ci des microvillosités vont dégrader les peptides en AA. Les graisses vont, dans un premier temps, être émulsionnées par l'action des sels biliaires provenant du foie, puis être transformées en monoglycérides et acides gras ou glycérol et acides gras par la lipase pancréatique (Simmonds, Redgrave, et Willix 1968).

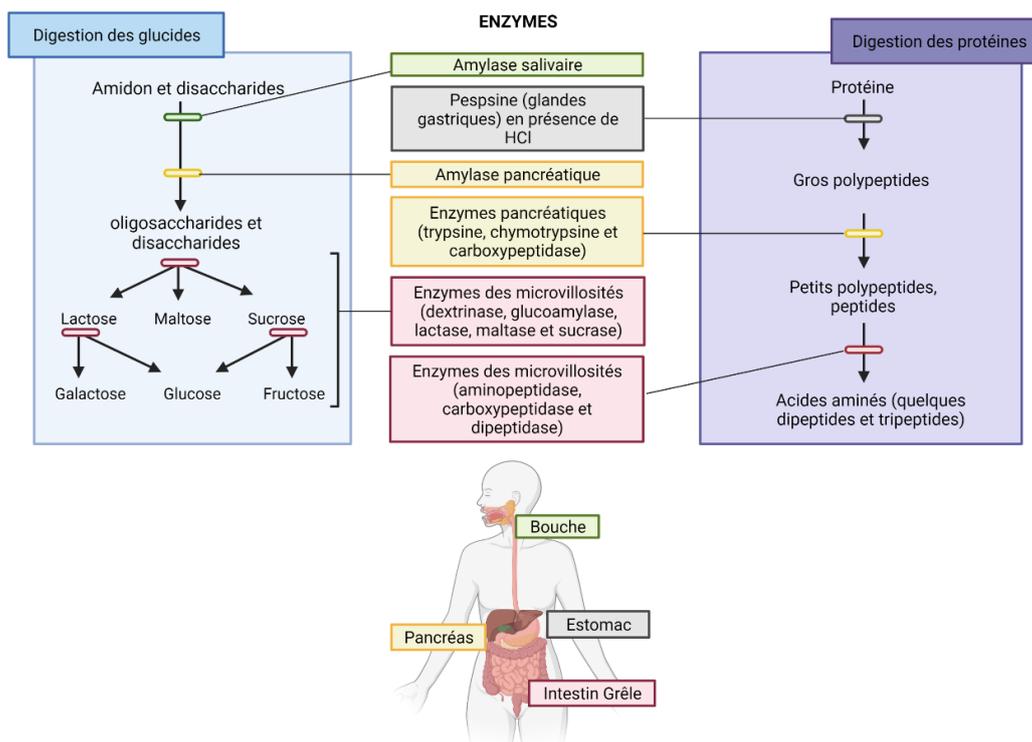


Figure 2. Processus de dégradation des nutriments dans le système digestif

Les éléments monosaccharidiques, les AA et les acides gras à chaînes courtes pénètrent dans les capillaires des villosités intestinales et entrent dans le foie par la veine porte. Les acides gras à chaînes longues, quant à eux, pénètrent dans les vaisseaux chylifères des villosités intestinales et sont transportés dans la lymphe vers la circulation systémique (Dixon, Raghunathan, et Swartz 2009).

Au cours de l'avancée du chyme, un liquide alcalin riche en chylomicrons et triglycérides est produit lors de la digestion dans l'intestin grêle (Hall, Murthy, et Wyrick 1986). La progression est lente et facilitée par les fibres (cellulose). Lorsqu'il ne reste presque plus de nutriments à absorber, le chyme arrive au dernier compartiment, le côlon. Il n'y a pas d'enzyme digestive à ce stade et des bactéries de fermentation (nous détaillerons plus loin l'importance de ces bactéries) vont libérer des gaz et synthétiser la vitamine K, vitamine qui pourra alors être absorbée avec l'eau contenue dans le chyme (LeBlanc et al. 2013). La matière résiduelle non digérée et solide donnera ainsi les fèces.

Adossés à ces 4 compartiments principaux, d'autres organes arrivent en soutien comme le pancréas, la vésicule biliaire et le foie. L'arrivée du chyme dans le duodénum provoque la libération de la sécrétine et de la cholécystokinine (CCK) par les cellules endocrines de la paroi

du duodénum (Schaffalitzky de Muckadell et al. 1986). La CCK et la sécrétine pénètrent alors dans la circulation sanguine. La CCK contenue dans le sang, en atteignant le pancréas, déclenche la sécrétion de suc pancréatique riche en enzymes tandis que la sécrétine induit une abondante sécrétion de suc pancréatique riche en ions bicarbonates. Enfin la sécrétine stimule la sécrétion de la bile par le foie et la CCK agit sur la vésicule biliaire lui faisant libérer la bile qu'elle a emmagasinée (Koop 1990).

La vésicule biliaire est un sac musculéux qui stocke la bile produite par le foie. Le canal cholédoque fait la jonction entre la vésicule et le duodénum permettant la sécrétion de la bile. Un système de recyclage est mis en place pour réabsorber les sels biliaires dans l'iléon avant de rejoindre le foie (Deng et Bae 2020). Le pancréas dans ce système a une fonction exocrine, en effet, il produit les sucs pancréatiques nécessaires à la digestion des protéines, des glucides et de l'amidon (Beaudoin, St-Jean, et Grondin 1989). Il effectue également un contrôle hormonal avec la gastrine.

Chaque processus de la digestion est médié par le contrôle du système nerveux entérique (SNE). Ce système spécifique au tube digestif appartient également au système nerveux autonome (SNA) responsable de l'ensemble des fonctions involontaires de l'organisme. Par exemple dans le cas d'une activité intense de l'organisme, le SNE est inhibé afin de diminuer fortement les fonctions de digestion consommatrices d'énergie et non essentielles. Or, La digestion ne pouvant se stopper totalement sans entraîner des complications pathologiques, le SNE est capable de maintenir les fonctions de motilité et de sécrétion.

Cette capacité est donnée par une innervation intrinsèque, localisée dans les parois musculaires du tube digestif, reliée par une innervation extrinsèque au système nerveux central. La composante intrinsèque s'organise en deux plexus, le plexus de Meissner ou sous-muqueux et le plexus Auerbach ou myentérique (Annexe I). Du point de vue de la digestion, ces plexus régulent la production de sécrétions (hormones, électrolytes) et la motilité du tube digestif en agissant sur la segmentation et sur le péristaltisme (S. Schneider, Wright, et Heuckeroth 2019; Gonkowski et Rytel 2019).

Pour ces deux plexus, des neurones de types sensitifs, moteurs et des interneurones sont retrouvés (Vergnolle et Cirillo 2018). L'innervation extrinsèque représente l'ensemble des projections nerveuses vers l'estomac et l'intestin (Uesaka et al. 2016). De façon schématique

un premier neurone va s'articuler avec un deuxième neurone situé dans un des plexus (Costa 2004). L'innervation extrinsèque est responsable de la diminution de la distension et de l'étirement du tube digestif. Une revue intéressante détaille le fonctionnement de ces innervations (Furness 2000).

Le tube digestif participe également à la production de neuromédiateurs (noradrénaline, neuropeptine, acétylcholine, GABA, sérotonine, dopamine, VIP) (Auteri, Zizzo, et Serio 2015). Cette production est parfois même majoritairement réalisée par l'intestin, c'est notamment le cas de la sérotonine avec une production de 85 % (Sjölund et al. 1983).

Les neurones qui tapissent notre tube digestif naissent de la même zone embryonnaire que les neurones du système nerveux central. Au cours de la gestation, les cellules de la crête neurale migrent pour atteindre les différentes parties du tube digestif que nous avons vu, lui-même en cours de formation (Brokhman et al. 2019). Dès la sixième semaine embryonnaire, les premiers mouvements intestinaux se produisent. Avec plus 500 millions de neurones dans l'intestin, ce qui représente une quantité plus importante que le système nerveux central, l'intestin a gagné le titre de deuxième cerveau.

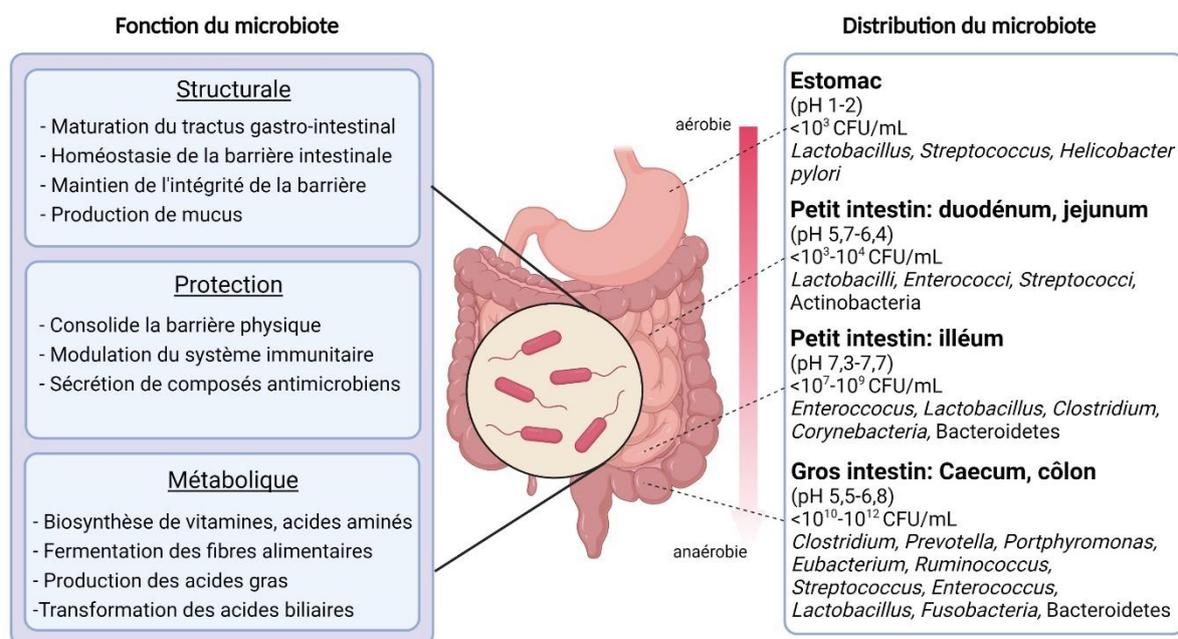
## **2.2. Le microbiote intestinal**

Le tube digestif abrite 2 à 10 fois plus de micro-organismes que le nombre de cellules constituant notre corps. Cet ensemble de bactéries, virus, levures, bactériophages et champignons non pathogènes représentent notre microbiote intestinal (ou flore intestinale). Cette flore, n'étant pas pathogène, a longtemps été considérée comme n'ayant pas de fonction véritable. Pourtant, alors que notre organisme possède un système immunitaire performant pour lutter contre les bactéries responsables de maladies, il reste tolérant à l'égard de ce microbiote en vivant en harmonie avec celui-ci.

### *2.2.1. Le rôle du microbiote intestinal dans le système digestif*

Le rôle du microbiote reste encore à l'étude. Nous savons qu'il représente un organe à part entière tant ses fonctions sont nombreuses : barrière protectrice contre des xénobiotiques à potentiel pathogène, il intervient dans les processus métaboliques et possède une fonction structurale (Figure 3).

**Fonction structurale**\_ le microbiote intestinal normal influence de nombreux aspects physiologiques chez l'hôte sain, notamment au niveau du développement neuronal (Catron et al. 2019), sur le système immunitaire (Gaboriau-Routhiau et Cerf-Bensussan 2016), sur le tractus gastro-intestinal (A. Ali, Tan, et Kaiko 2020), la régénération tissulaire, la carcinogenèse (Wong et Yu 2019), l'homéostasie osseuse, le métabolisme et le comportement (Sommer et Bäckhed 2013). Le microbiote participe au renouvellement cellulaire de la barrière intestinale et à la production de mucus (Paone et Cani 2020). La maturation du tractus gastro-intestinal est induite par de nombreux facteurs et l'un d'entre eux est le microbiote intestinal (C. L. Wagner, Taylor, et Johnson 2008). Le microbiote contribue à l'intégrité de la barrière de l'épithélium intestinal par le maintien des jonctions intercellulaires. Il joue un rôle important dans la régulation des protéines de jonctions. Certaines souches vivantes d'*Escherichia coli Nisseria* et d'*Escherichia coli Nissle* ont montré une modification de l'expression des protéines des jonctions serrées. En augmentant la production de Zonula Occludens (ZO), le microbiote favorise l'augmentation de la résistance transépithéliale (Lutgendorff, Akkermans, et Söderholm 2008). Il a été également démontré que *B. thetaiotaomicron* induit l'expression de SPRR2A, une protéine importante pour la membrane plasmique et le maintien des desmosomes (Hooper et al. 2001).



*Fonction protectrice*\_ Le microbiote intestinal fournit également à son hôte une barrière physique aux pathogènes entrants. La diversité des bactéries évite la prédominance d'une seule espèce bactérienne ou la colonisation du tube digestif par d'autres micro-organismes qui seraient pathogènes par exclusion compétitive. Il stimule également l'hôte à produire divers composés antimicrobiens. Les cellules épithéliales de l'intestin possèdent des récepteurs spécifiques aux molécules produites par les bactéries. Un dialogue cellulaire se met en place lors de la fixation de ces molécules sur le récepteur pouvant entraîner des réactions inflammatoires en réponse aux signaux émis par certains groupes de bactéries. Le microbiote joue alors un rôle actif dans la fonction immunitaire (Sekirov et al. 2010).

*Fonction métabolique*\_ Le microbiote synthétise également des acides gras, absorbés par la suite dans notre intestin grêle. De nombreuses espèces bactériennes ont été impliquées dans le métabolisme des fibres alimentaires en acides gras saturés, qui représentent une partie importante de la source d'énergie humaine. La production du butyrate, par exemple, est à la fois une source d'énergie pour l'hôte, mais elle prévient également de l'accumulation de sous-produits métaboliques potentiellement toxiques comme le D-lactate (Bourriaud et al. 2005).

Un autre exemple de l'implication du microbiote dans la fonction métabolique est l'inhibition de la lipoprotéine lipase (LPL). Le microbiote intestinal module l'augmentation de l'activité de la LPL dans les tissus adipeux favorisant l'absorption accrue d'acides gras dans les adipocytes (Bäckhed et al. 2004). Enfin, la métabolisation des fibres par les bactéries fermentatrices, participant de ce fait à la transformation des nutriments lors de la digestion, s'accompagne d'émissions de méthane et autres gaz renforçant l'environnement faible en oxygène du côlon (Gerasimidis et al. 2020).

Le microbiote intestinal est présent de l'œsophage jusqu'au côlon. Cependant, il diffère en fonction de sa localisation dans le tube digestif. L'estomac et l'œsophage en conditions physiologiques sont relativement stériles à cause de leurs pH acides. Le duodénum et le jéjunum comprennent essentiellement des bactéries aérobies ou anaérobies facultatives. L'iléon contient de façon prédominante des bactéries anaérobies tandis que le côlon possède des bactéries anaérobies strictes.

### 2.2.2. *Le dialogue entre l'hôte et le microbiote*

Les recherches pour comprendre la composition, les fonctions et mécanismes d'interaction de ce microbiote avec l'Homme sont grandissantes. Outre la flore intestinale, nous avons découvert que d'autres organes étaient colonisés par des micro-organismes vivant en symbiose avec ces derniers. Nous parlons de microbiotes cutanés, vaginaux, oropharyngés, pulmonaires et intestinaux (Di Domenico et al. 2019) (Smith et Ravel 2017) (Dickson et al. 2016). Les muqueuses digestives et respiratoires sont physiologiquement colonisées par environ 100 trillions de bactéries et par un plus petit nombre de champignons, d'archées et de virus (Lynch et Pedersen 2016), (Nishida et al. 2018). C'est pourquoi nous détaillerons plus particulièrement le rôle et les fonctions des bactéries dans ce microbiote.

Les interactions entre le microbiote intestinal et l'hôte ne sont pas liées au hasard. Plusieurs mécanismes d'interaction existent tels que la symbiose, l'antagonisme, l'exclusion compétitive ou encore le biofilm (Marsh et Zaura 2017). Toute association entre deux populations d'espèces qui vivent ensemble est symbiotique, que l'espèce profite, soit nuisible ou n'ait aucun effet l'une sur l'autre. La symbiose correspond à l'association durable de plusieurs micro-organismes indispensables à leurs survies ou tout simplement mutuellement bénéfiques. Parmi les modes de vie bénéfiques, nous avons le mutualisme, qui améliore les conditions biologiques des deux espèces, le commensalisme, où une espèce profite de l'autre sans l'affecter, et le parasitisme où une espèce héberge l'autre. Dans la plupart des cas de parasitisme, l'hôte finit par subir des dommages à un instant donné du cycle de vie du parasite. Dans le cas d'un mode de vie nuisible, nous retrouvons : la compétition, l'antagonisme (inhibition d'un micro-organisme par un autre) et la prédation (consiste à se nourrir d'une autre espèce). Ce lien permet à l'hôte d'échapper à de nombreuses infections intestinales puisque les bactéries qui peuplent nos intestins vont être antagonistes à certains agents pathogènes. Les exclusions compétitives s'effectuent par la compétition pour les nutriments entre les micro-organismes en place et ceux souhaitant s'y implanter.

Des études récentes ont mis en évidence plusieurs signatures bactériennes intestinales chez l'Homme, regroupées en 3 entérotypes. Les entérotypes sont nommés selon la prédominance du genre bactérien : *bacteroides*, *prevotella* et *ruminococcus* (Arumugam et al. 2011). Ces entérotypes ne sont pas influencés par le sexe, l'âge, ou les origines géographiques, mais seraient plutôt liés à l'alimentation. Par exemple, une alimentation riche en graisse

animale et en protéines favoriserait l'entérotype *bacteroides*, une alimentation riche en glucides serait propice à l'entérotype *prevotella*, tandis qu'une alimentation riche en amidon conduirait à un entérotype de type *ruminococcus* (G. D. Wu et al. 2011) (Salonen et al. 2014).

Afin de bien comprendre l'abondance et la diversité existante dans le microbiote intestinal, revenons sur la classification phylogénétique établie à la suite des études de métagénomique et du séquençage 16S. Les micro-organismes sont sous-divisés en 3 domaines : Bacteria, Archaea, Eucaryota. Le domaine des Bacteria est ensuite divisé en de nombreux phyla. Par exemple, 7 sont retrouvés dans les microbiotes d'organes : phylum Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Fusobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobiota et Cynobacteria (Bäckhed et al. 2005). Ces phyla seront à nouveau subdivisés en classes, ordres, familles et enfin souches (Figure 4). Parmi les 7 mentionnés, 3 phyla sont conservés chez tous les individus, les Firmicutes (60 à 80 %), les Bacteroidetes (20 à 40 %) et les Actinobacteria (Arumugam et al. 2011).

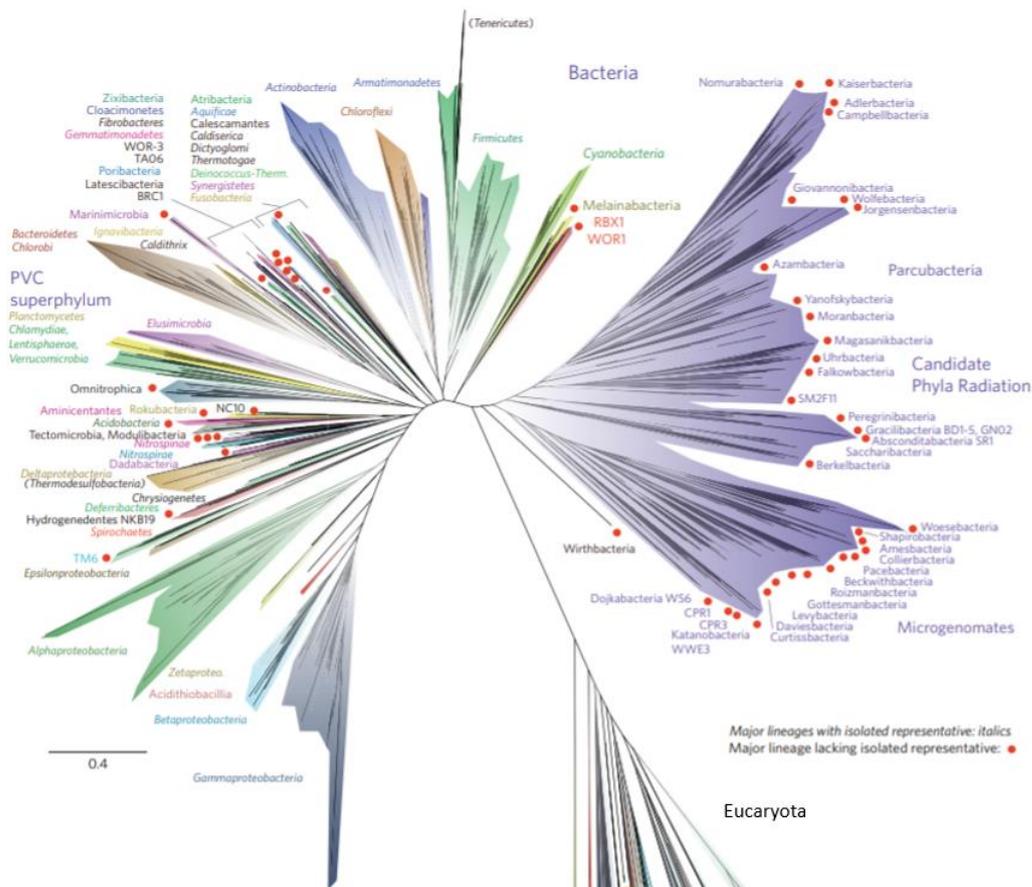


Figure 4. Arbre phylogénétique du domaine Bacteria englobant la diversité totale représentée par les génomes séquencés. Figure de Hug et al. 2016.

L'abondance d'une famille de bactéries est variable d'un individu à l'autre puisque la composition du microbiote est aussi liée aux facteurs génétiques et environnementaux. La conservation des espèces dans le temps chez un individu reste néanmoins très stable et ce, malgré les changements importants qui auront lieu au cours de la vie de l'individu. Le microbiote a donc une forte capacité à résister aux agressions (traitements antibiotiques, pathologies). Même après un changement important, il revient à son état d'origine en quelques semaines (Shapira 2016).

Néanmoins, le changement de régime alimentaire peut modifier au moins partiellement l'équilibre de l'écosystème intestinal. Des modifications transitoires de l'équilibre microbien peuvent intervenir avec l'apport des probiotiques (souches bactériennes) ou prébiotiques (substrats bactériens exogènes).

### 2.2.3. La modulation du microbiote

Le développement du microbiote et sa diversité se construisent pendant les 3 premières années de vie d'un individu. La construction de l'écosystème intestinal est progressive puisqu'à la naissance, le corps est considéré comme « stérile » *in utero*. La première source de colonisation intervient avec l'accouchement et le transfert du microbiote fécal et vaginal de la mère à l'enfant. La diversification du microbiote se poursuit avec l'alimentation (allaitement, diversification alimentaire). Les bactéries de la famille des Lactobacilles (*Enterococcus*) et des Entérobactéries (*E. coli*) ainsi que des Bifidobactéries colonisent alors le tube digestif riche en oxygène. Nommées « primo-colonisatrices », les premières bactéries font diminuer le taux d'oxygène progressivement, ce qui va ensuite favoriser l'arrivée de bactéries anaérobies strictes comme les *Clostridium leptum* (Cassard et al, 2021). Le contact avec le personnel médical et les parents participe à la complexification progressive du microbiote. Il a aussi été découvert que les microbiotes intestinaux diffèrent entre les enfants nés par césarienne ou par voie basse (Shao et al. 2019). Ainsi, le type de microbiote acquis à la naissance est essentiel pour le microbiote à l'âge adulte, car il peut perturber l'implantation d'autres bactéries au cours du développement. Une trop grande utilisation d'antibiotiques ou un cadre de vie trop aseptisé peut retarder ou compromettre la mise en place de la symbiose entre l'hôte et son microbiote. Une altération de cette symbiose peut entraîner un risque accru de maladies inflammatoires ou d'allergies au cours du développement de l'enfant (Cukrowska et al. 2020).

A l'âge adulte, le microbiote est stable et résilient aux modifications, cependant certaines altérations du microbiote semblent être responsables ou participer au développement de pathologies. La communauté scientifique se questionne donc sur les liens possibles entre le microbiote et la santé de l'hôte. La prédominance de bacteroidetes a été observée chez les individus atteints d'obésité. Les modifications du microbiote intestinal ne sont pas seulement induites par l'obésité, mais peuvent également favoriser le développement de l'obésité (Ubags et Marsland 2019). Des études suggèrent que le microbiote intestinal joue un rôle dans le diabète de type 2. Les personnes atteintes de diabète de type 2 présentaient une plus faible abondance de Firmicutes et de Clostridia de classe 1 et une augmentation non significative des Bacteroidetes et Proteobacteria par rapport aux personnes sans diabète (Larsen et al. 2010). Des avancées sur la maladie de Parkinson montrent qu'une perturbation de l'axe microbiote intestin-cerveau joue un rôle essentiel dans la pathogenèse de la maladie. Un microbiote dysbiotique pourrait être le déclencheur et/ou facilitateur de la neuro-inflammation nécessaire à la neurodégénérescence (Keshavarzian et al. 2020). La perturbation dans le développement de processus neuronaux appelés "axe cerveau-intestin" est potentiellement à l'origine d'une stimulation neurogène anormale du système nerveux entérique conduisant probablement aux syndromes du côlon irritable (Rhee, Pothoulakis, et Mayer 2009). Le microbiote peut donc être le pivot entre l'environnement et les maladies.

#### *2.2.4. Interaction du microbiote avec les xénobiotiques*

La composition du microbiote intestinal a montré son importance dans la modulation des métabolites produits par notre organisme. La différence de diversité microbienne chez les individus est évoquée comme étant un des facteurs expliquant les différents types de réponses aux thérapies. Nicholson et al. considèrent l'existence d'un « continuum complexe entre le métabolisme endogène du génome de l'hôte, contrôlé par voie enzymatique, et le métabolisme xénobiotique, qui concerne généralement des composés étrangers tels que des médicaments, mais qui pourrait inclure une gamme de composés non synthétisés ou utilisés par l'hôte » (Nicholson et Wilson 2003).

Chaque type de cellule possède un métabolome intracellulaire caractéristique en fonction de sa fonction biologique. Chaque espèce du microbiote possède des métabolomes intracellulaires et extracellulaires spécifiques qui contribuent au contenu de l'intestin. Les échanges avec l'environnement extracellulaire pour les cellules de l'hôte et les bactéries sont

constants. Puisque l'environnement extracellulaire comprend les métabolites sécrétés et excrétés par les 2 parties ainsi que les nutriments issus de la digestion, ces métabolites peuvent être co-métabolisés. Ils sont alors nommés sym-xénobiotiques. La signature des métabolites sym-xénobiotiques que l'on retrouve dans les fluides de l'hôte, comme l'urine, peut donner un aperçu de l'interaction dynamique entre la communauté microbienne intestinale et l'hôte et permettre de comprendre la dysbiose et les processus pathologiques liés aux micro-organismes intestinaux (Nicholson, Holmes, et Wilson 2005).

Cette diversité de métabolisation possible et imprévisible pour un xénobiotique pourrait être un facteur dans la survenue de réactions indésirables. Dès les années 1980, des chercheurs ont découvert que la bactérie *Eggerthella lenta* (phylum Actinobacteria) inactivait la digoxine, un glycoside cardiaque, connu pour induire une forte toxicité. L'inhibition de la digoxine diminue de ce fait l'index thérapeutique de celle-ci dans le traitement des insuffisances cardiaques. Une autre étude montre qu'un métabolite microbien produit par *C. difficile* agit comme un inhibiteur compétitif des sulfotransférases hépatiques, ce qui augmente le risque d'hépatotoxicité (Lindenbaum et al. 1981). L'activité  $\beta$ -glucuronidase de *E. coli*, *B. vulgatus* and *C. ramosum* conduit à la conversion du SN-38-G, un métabolite actif non toxique de l'Irinotecan utilisé dans les chimiothérapies contre le cancer du côlon, en un métabolite SN-38 toxique (Gagné et al. 2002) (Wilson et Nicholson 2017).

### **3. Les barrières biologiques : une protection suffisante contre les xénobiotiques ?**

Au sein du système digestif, nous avons évoqué à de nombreuses reprises la fonction de barrière contre les agents extérieurs. Ces barrières, que nous allons détailler dans cette partie, vont nous permettre de comprendre les actions complémentaires mises en place à l'échelle cellulaire contre les xénobiotiques.

#### **3.1. Rôles et structure des barrières biologiques**

Une barrière biologique agit comme une interface entre le corps et son environnement extérieur. Les barrières biologiques font office de garde du corps à chaque voie d'entrée. La peau possède une barrière cutanée, les voies respiratoires ont une barrière pulmonaire et la

voie orale ou digestive est constituée d'une muqueuse buccale et d'une barrière intestinale. Chacune de ces barrières empêche l'entrée d'éléments extérieurs vers l'intérieur de notre organisme. Pour autant, elles ne sont pas imperméables à toutes les molécules. En effet, la fonction semi-perméable des barrières leur permet de laisser passer des molécules de manière sélective. D'autres barrières biologiques prennent ensuite le relais à l'intérieur de l'organisme. C'est le cas notamment pour le cerveau avec la barrière hémato-encéphalique et le système sanguin qui possède une barrière endothéliale. Ces barrières sont toutes composées d'une couche de cellules épithéliales organisées spécifiquement en fonction de la spécificité de l'organe.

La barrière cutanée est composée d'un épiderme qui joue un rôle de perméabilité sélective vis-à-vis de l'environnement extérieur. La différenciation terminale des kératinocytes de l'épiderme apporte ainsi une protection physique. Les mélanocytes par exemple, par leur rôle photo-protecteur, dû à l'action de facteurs d'absorption tels que la mélanine, concourent à la barrière dite chimique en protégeant contre les UV (Abdayem et Haftek 2018). Enfin la barrière cutanée possède une composante immunitaire adaptative initiée par les cellules de Langerhans.

Chez l'adulte, l'épithélium alvéolaire de la barrière pulmonaire est constitué de deux types de cellules épithéliales spécialisées. La cellule épithéliale pavimenteuse alvéolaire de type I représente environ 93 % de la surface alvéolaire, tandis que la cellule épithéliale alvéolaire cuboïdale de type II est une cellule productrice de surfactant (Hermanns et al. 2004 ; Mason 2006). La morphologie des cellules épithéliales alvéolaires assure un contact étroit entre l'air et le sang pour une meilleure diffusion des gaz respiratoires. Les cellules épithéliales alvéolaires ont d'importantes fonctions de défense et d'immuno-modulation (Guillot et al. 2013).

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est une barrière biologique qui protège du passage de la plupart des composés du sang vers le cerveau. La BHE est créée par les cellules endothéliales qui forment les parois des micro-vaisseaux cérébraux. Cette barrière est composée de plusieurs types de cellules : cellules endothéliales, astrocytes, péricytes et cellules microgliales (Brightman 1977; Blanchette et Daneman 2015). Aucun type de cellule du cerveau ne fonctionne seul, mais au contraire, elles sont en communication constante avec les autres types de cellules de l'unité neurovasculaire. Les cellules endothéliales présentes

dans la BHE diffèrent des cellules endothéliales présentes dans le reste du corps. Elles ne sont pas fenêtrées, ont plus de jonctions serrées, et ont une résistance électrique élevée pour limiter les mouvements entre cellules adjacentes (Westergaard et Brightman 1973).

La principale fonction de la barrière endothéliale est de maintenir le sang dans les vaisseaux sanguins. Elle est organisée en différentes couches de cellules ; cellules endothéliales pavimenteuses reposant sur une mince couche de tissu conjonctif ; cellules musculaires lisses fusiformes dans une matrice riche en fibres d'élastine et collagène (Puissant et al. 2014). Les vaisseaux sanguins participent à la circulation de l'oxygène, des métabolites, des hormones et à l'élimination des produits terminaux du métabolisme, pour l'ensemble des organes. Ces éléments peuvent diffuser à travers la barrière endothéliale semi-perméable (Malik, Lynch, et Cooper 1989). De plus, la barrière est capable d'émettre et de répondre à de nombreux signaux chimiques, favorisant la régulation de l'adhésion cellulaire, le renouvellement cellulaire et la perméabilité des vaisseaux. Enfin, elle joue un rôle clé dans le contrôle du diamètre des vaisseaux puisqu'elle peut changer la vasomotricité en fonction des besoins tissulaires par la production de monoxyde d'azote à l'effet vasodilatateur.

La barrière intestinale tout comme la barrière cutanée est la première barrière physique rencontrée par les agents extérieurs.

### **3.2. La barrière intestinale**

La barrière intestinale est constituée de plusieurs tuniques. La première, la muqueuse, est celle qui confère les propriétés de barrière contre les xénobiotiques et d'absorption des nutriments. Dans les deux tuniques suivantes (sous-muqueuse et musculuse) se trouvent les fibres neuronales du système nerveux entérique. La tunique musculuse possède un anneau circulaire interne et un anneau longitudinal externe qui participent à la segmentation du bol alimentaire et au péristaltisme. Enfin la dernière tunique, la séreuse, est un tissu de soutien correspondant au mésentère, une partie du péritoine qui attache l'intestin à l'abdomen. La barrière intestinale assure une fonction protectrice et interactive. Conçue comme une barrière à la fois physique, immunitaire et chimique, elle se caractérise par une très grande capacité d'adaptation aux variations de l'environnement lui permettant de résister aux agressions (Figure 5).

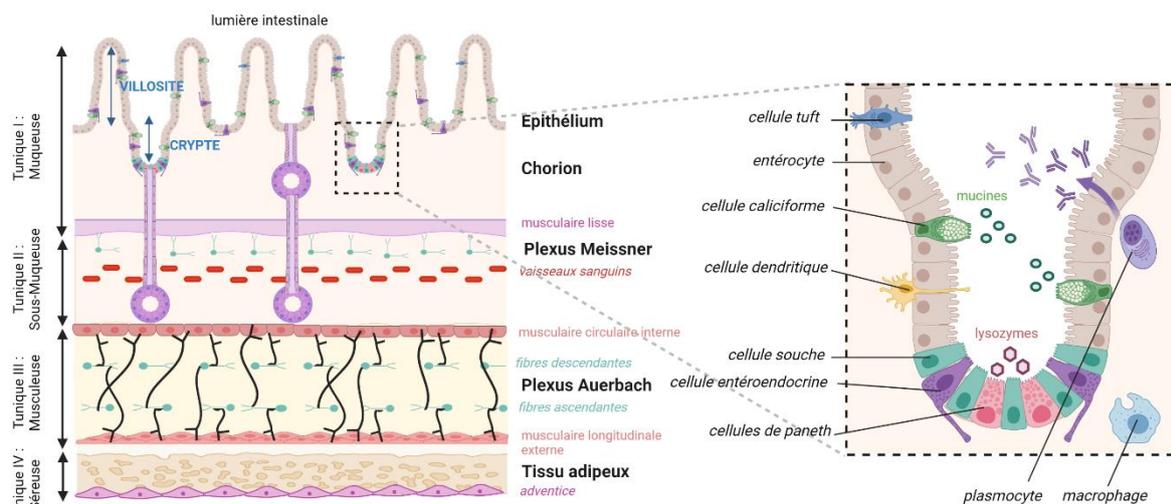


Figure 5. Structure et morphologie de la barrière intestinale

La barrière mécanique intestinale est composée d'une monocouche de cellules épithéliales qui sépare le contenu luminal, où circule le bol alimentaire, de la lamina propria sous-jacente. L'épithélium intestinal est organisé en cryptes et villosités qui augmentent la surface d'absorption (Beumer et Clevers 2016). Les cryptes sont des invaginations épithéliales, également appelées cryptes de Lieberkühn dans le côlon (Håkanson et al. 1994). Les cryptes sont connues pour abriter les cellules souches qui alimentent l'auto-renouvellement épithélial (Clevers 2013) (Branca, Gulisano, et Nicoletti 2019). Dans l'intestin, il existe deux grandes lignées épithéliales différenciées : une lignée absorbative et une lignée sécrétoire (Salvo-Romero et al. 2015). Les entérocytes sont responsables de l'absorption des nutriments et apportent une protection physique avec des protéines de jonction (M. Z. Fan et al. 2004) (Hamid et al. 2007) (Fuqua, Vulpe, et Anderson 2012).

La barrière chimique intestinale est généralement représentée par la lignée sécrétoire, les cellules de Paneth, qui sécrètent des molécules antimicrobiennes et contiennent des granules de lysozyme. Elle est aussi constituée de cellules caliciformes sécrétant des mucines à l'origine du mucus (Y. Wu et al. 2019) (J. Ma, Rubin, et Voynow 2018). Les cellules Tuft sont des cellules épithéliales sécrétoires qui semblent avoir un lien avec l'hypersensibilité de type 2 dans l'intestin grêle. Les cellules Tuft ont la capacité de produire des molécules effectrices, dont l'IL-25 et les eicosanoïdes impliqués dans l'allergie ainsi que l'acétylcholine (C. Schneider, O'Leary, et Locksley 2019). Une variété de cellules entéro-endocrines productrices

d'hormones a également été identifiée (Lebrun et al. 2017 ; Worthington, Reimann, et Gribble 2018).

L'ensemble des cellules constituant la barrière intestinale provient des cellules souches intestinales (CSI). Les CSI produisent les progéniteurs intestinaux qui après différenciation peuvent donner les différents types cellulaires entérocytaires et sécrétoires (Stedman, Nigro, et Sansonetti 2016). Au cours de leur différenciation, les cellules migrent en haut des cryptes et des villosités tandis que le pool de cellules souches et des progéniteurs restent à la base des cryptes.

La barrière immunologique intestinale fait intervenir des immunoglobulines (l'IgG A est prédominante dans la sécrétion muqueuse), des cytokines (IL-25, IL-33) et des alarmines qui sont produites par les cellules épithéliales (Angkasekwinai et al. 2007) (Hammad et Lambrecht 2015) (Lopetuso, Chowdhry, et Pizarro 2013). Des cellules M particulières, situées au-dessus des plaques de Peyer, participent indirectement à la protection immunitaire car elles peuvent présenter des antigènes directement aux lymphocytes T (Snoeck, Goddeeris, et Cox 2005; Kobayashi et al. 2019). Les cellules dendritiques dont la spécialité est la présentation des antigènes détectent les antigènes d'origine microbienne ou alimentaire provenant de la lumière intestinale. Récupérant continuellement les antigènes du contenu luminal commensal à l'état stable, les cellules dendritiques sont tolérogènes. En effet, elles suppriment les réponses immunitaires contre ces antigènes en induisant les cellules T régulatrices. La fonction de ces cellules dendritiques est donc un maintien de l'homéostasie intestinale (Esterházy et al. 2016).

Un ensemble de mécanismes existe de l'estomac à l'intestin pour empêcher l'absorption et la pénétration de macromolécules exogènes ou de micro-organismes, tels que les bactéries, les champignons et les virus, à travers la barrière intestinale. Le faible pH gastrique, associé aux enzymes protéolytiques gastro-intestinales, contribue à la digestion des biomolécules (Lucas et al. 2008) (UmaMaheswari et al. 2016). Les glycoprotéines du mucus forment une couverture efficace pour protéger l'épithélium intestinal (Allen et al. 1984). Une fois que l'antigène a pénétré dans les entérocytes, les enzymes lysosomales dégradent les biomolécules (Derde et al. 2017). Les macrophages de la lamina propria sont chargés de les phagocyter et de les digérer complètement (Galant 1976; Okumura et Takeda 2017). La

protection contre les micro-organismes et xénobiotiques est également assurée par les jonctions cellulaires qui relient fermement les cellules épithéliales entre elles.

### **3.3. La perméabilité de la barrière**

#### *3.3.1. Les voies de perméabilité*

Les membranes plasmiques tout comme les barrières tissulaires ont un degré de perméabilité dépendant de la présence de jonctions intercellulaires lâches ou serrées. Ces jonctions ne sont pourtant pas les seuls acteurs de la perméabilité. Plusieurs voies de passages à travers la membrane plasmique sont possibles soit par diffusion passive soit par un transport actif à la faveur de canaux ioniques, pores ou transporteurs. La bicouche lipidique des membranes plasmiques cellulaires permet une diffusion facilitée pour certains composés (Knauf et al. 2011).

*La diffusion*\_ Le passage de molécules à travers l'épithélium intestinal est un phénomène qui fait intervenir des mécanismes de diffusion passifs (sans utilisation d'énergie) et actifs (avec utilisation d'énergie). Le transport de substances entre les cellules dans l'espace intercellulaire est nommée diffusion paracellulaire, tandis que le transport des substances traversant les membranes plasmiques aux niveaux apicaux et basolatéraux est désigné de diffusion transcellulaire (Hollander et Kaunitz 2020).

La diffusion paracellulaire étant soumise à un gradient de concentration, elle n'est donc pas la voie prépondérante à l'absorption des nutriments (Pade et Stavchansky 1997). Les produits pharmaceutiques hydrophiles ne traversent pas aisément la bicouche lipidique des membranes (Cano-Cebrián et al. 2005). Des efforts ont donc été déployés pour augmenter le transport paracellulaire et améliorer la faible biodisponibilité intestinale des médicaments avec des excipients tels que les acides gras à chaînes moyennes ou le chitosan (Guan et al. 2014 ; Thanou et al. 2001 ; Yan et Ajuwon 2017).

La diffusion transcellulaire concerne le passage d'une molécule au travers d'une cellule. Le flux de molécules s'effectue avec des vitesses de diffusion très variées selon la taille et la charge des molécules (Vojdani 2013; Butler et Dressman 2010). Les molécules polaires non chargées comme les gaz (CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>) ou l'eau ont une très forte perméabilité au travers des membranes et traversent la membrane par diffusion. À l'inverse les molécules polaires

chargées comme les ions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) ont une très faible perméabilité (Lamson et al. 2020). C'est pourquoi des canaux ioniques existent pour permettre la circulation de ces ions. Puis il y a les molécules de poids moléculaires supérieurs à 150 Daltons (Da) (adénosine triphosphate (ATP), glucose, etc.) qui vont alors utiliser d'autres mécanismes puisqu'elles ne peuvent ni emprunter les canaux ioniques ni passer par diffusion.

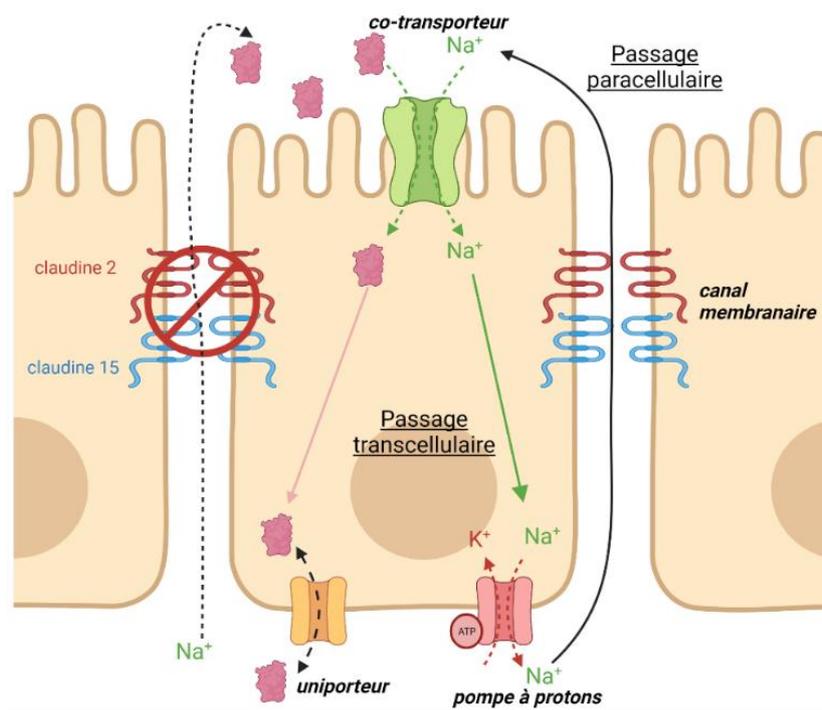
L'internalisation, puis le transport intracytoplasmique, sont la voie la plus utilisée dans l'absorption des nutriments (Salvo Romero et al. 2015). Après fixation spécifique de la particule sur un récepteur membranaire en apical, une partie de la membrane plasmique entoure la particule et l'internalise complètement. Puis, par transcytose, les vésicules qui ne seront pas interceptées par les lysozymes vont traverser d'un bout à l'autre la cellule sans être modifiées. La sortie de la cellule se fait par exocytose; la particule contenue dans une vésicule de transport va fusionner avec la membrane en basolatéral et déverser le contenu dans le milieu extracellulaire. D'autres moyens d'entrée et de sortie de la cellule sont exercés à l'aide de transporteurs actifs (Sasaki et Noda 2007).

*Les transporteurs*\_ Les transporteurs passifs font passer les molécules dans le sens du gradient de concentration (du compartiment qui en a le plus vers celui qui en a le moins). Le passage s'accompagne d'une modification conformationnelle des protéines transmembranaires constituant le transporteur (Erokhova et al. 2016). Contrairement aux pompes, ils ne nécessitent pas d'apport en énergie pour créer le gradient de concentration. C'est pourquoi, toutes les réactions qui font intervenir les transporteurs sont réversibles. Ce type de voie de transport est retrouvé dans toutes les membranes des cellules qui doivent échanger des molécules en vue du métabolisme, du stockage ou de l'élimination de déchets (Reboul 2019).

Les uniporteurs véhiculent une seule molécule, il s'agit d'une diffusion facilitée. Les antiporteurs transportent la molécule dans un sens tandis que l'ion responsable de la force de passage est emmené dans le sens inverse (Hunte et al. 2005). Les symporteurs favorisent le passage d'une ou plusieurs molécules qui vont dans le même sens que l'ion responsable de la force de passage (Dohán et Carrasco 2003). Le type co-transport est utilisé pour le passage du glucose dans les cellules épithéliales de l'intestin. Par exemple, le cotransporteur SGLT1 utilise le gradient de concentration en  $\text{Na}^+$  créé par les pompes dépendantes de l'ATP pour internaliser le glucose de la lumière intestinale dans les entérocytes (L. Chen, Tuo, et Dong 2016).

**Les pompes à proton**\_ Ce sont des transporteurs actifs qui créent des gradients de concentration de part et d'autre de la membrane pour faciliter le passage des cations et solutés. Les pompes sont des enzymes qui déplacent les protons contre le gradient de concentration ( $H^+$  du compartiment qui en a le moins vers le compartiment qui en a le plus) en utilisant l'énergie libérée par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP (Bruno et al. 2019).

La pompe  $Na^+/K^+$ /ATPase induit les gradients primaires de  $Na^+$  et de  $K^+$  (Figure 6). La production de protons  $H^+$  d'un côté de la membrane et l'accumulation de charges positives accélèrent la polarisation de la membrane. Cette polarisation s'oppose alors à l'entrée de nouvelles charges positives. Afin de rétablir l'équilibre des charges, des canaux ioniques font passer des ions chargés négativement pour compenser la charge positive des protons (Vagin, Sachs, et Tokhtaeva 2007). La constitution de ces gradients ioniques est coûteuse en énergie, car elle consomme près de 25 % du stock total d'ATP de la cellule. D'autres pompes acidifient l'estomac et éliminent le  $Ca^{2+}$  du cytoplasme des cellules (Nava et al. 2020).



**Figure 6.** Dialogue entre le flux paracellulaire et le flux transcellulaire. *Figure inspirée de Turner et al. 2014*

Les claudines 2 et 15 forment un canal membranaire qui facilite le flux de  $Na^+$  en paracellulaire. S'il est bloqué, le transport transcellulaire est impacté. Le transport transcellulaire favorise l'absorption des nutriments dans l'entérocyte grâce au  $Na^+$  via un co-transporteur en apical, un uniporteur et une pompe à proton ( $K^+/Na^+$ /ATP) en basolatéral.

*Les canaux membranaires*\_ Ce sont des transporteurs passifs constamment ouverts ou s'ouvrant et se fermant de façon transitoire sous l'action d'un mécanisme de régulation. Le canal est composé de plusieurs protéines intramembranaires qui forment des pores dans la membrane plasmique. Certains canaux fonctionnent conjointement avec des pompes ou des transporteurs pour transporter l'eau et les ions à travers les membranes cellulaires. Les canaux ioniques possèdent une spécificité ionique par pore. Le flux des ions au travers du canal ionique entraîne la création de potentiels électriques qui synchronisent le passage de molécules par les canaux, pompes et transporteurs (Duan et al. 2019). Les cellules épithéliales expriment principalement des canaux ioniques ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ) et des canaux hydriques afin d'augmenter les débits d'eau et de sels nécessaires à la sécrétion et à la réabsorption des fluides (Ghishan et Kiela 2012) .

### 3.3.2. *Les jonctions cellulaires*

Les jonctions cellulaires assurent la cohésion entre les cellules épithéliales adjacentes. L'adhésion entre cellules n'empêche pas certaines molécules de traverser (passage paracellulaire). Ces jonctions cellulaires sont de nature protéique et sont localisées différemment sur la membrane plasmique selon leur structure et leur rôle. Les protéines intracellulaires forment des plaques denses reliées au cytosquelette de la cellule, régulant la fonction jonctionnelle avec le réseau d'actine et de filaments intermédiaires, du côté cytoplasmique. Les protéines de liaison transmembranaires ont un domaine cytoplasmique relié au réseau cytosquelettique et un domaine extracellulaire communiquant avec la cellule voisine. Il existe plusieurs complexes de jonction cellulaire formant une barrière sélective semi-perméable : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les jonctions de communication (Figure 7).

*Les jonctions serrées*\_ Les jonctions serrées ou tight junction (TJ) séparent la membrane apicale du domaine basolatéral. En empêchant les nutriments de la membrane apicale de diffuser dans la membrane basolatérale, et inversement, elles contribuent au maintien de la polarité cellulaire. De plus, elles forment une barrière sélective régulant le passage des ions, des molécules, de l'eau et de solutés riches en phospholipides à travers l'espace paracellulaire. Les protéines membranaires TJ sont classées en 4 familles distinctes : les claudines (CL), les occludines (OCLN), les molécules jonctionnelles d'adhésion (JAM) et les Crumbs. Les claudines et les occludines sont les protéines des TJ les plus importantes dans le contrôle de la fonction

vitale des cellules. Les protéines TJ représentent l'échafaudage moléculaire sur lequel d'autres protéines cytoplasmiques vont interagir. Les protéines cytoplasmiques cinguline, Pals1 (Protéine Associée à Lin Seven 1), PATJ et MUPP1 (protéines à domaine multi-PDZ), TAMP (protéines MARVEL associées à la jonction serrée) et les ZO relient la membrane plasmique au cytosquelette (Raleigh et al. 2010). PATJ et MUPP1 sont deux homologues contenant un domaine PDZ, ce qui leur permet de se lier à l'OCLN et à d'autres molécules d'adhésion (pals, nectines, etc) (Adachi et al. 2009).

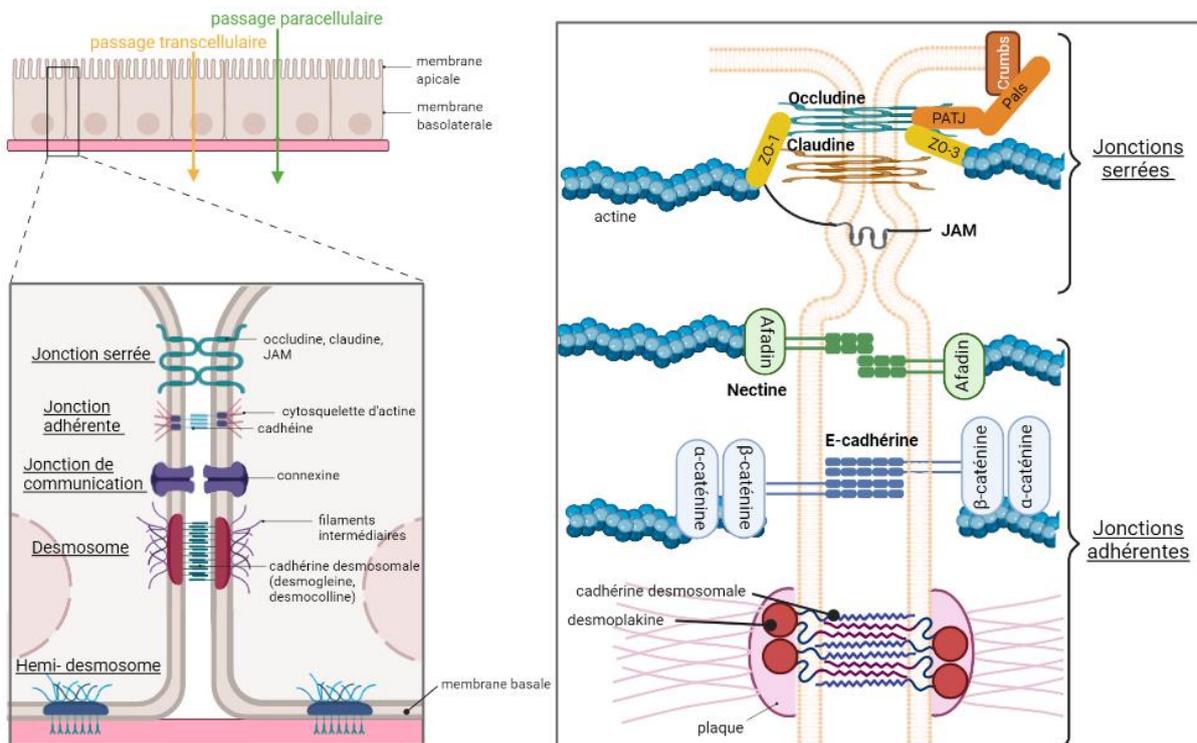


Figure 7. Organisation des jonctions cellulaires de la barrière intestinale

La famille des claudines ne comporte pas moins de 24 membres, elles sont à l'origine de la formation des TJ. Le type de claudines exprimé sur les cellules épithéliales confère une perméabilité sélective à certains ions (Holmes et al. 2006). Par exemple, la CL-4 est spécifique des ions  $\text{Na}^+$  tandis que la CL-16 est spécifique du  $\text{Mg}^{2+}$ . La localisation des claudines dépend également de leur type. Par exemple, l'expression de la CL-8 n'est détectable que dans l'iléon et le côlon distal alors que la CL-18 se retrouve dans l'estomac et le duodénum (Jovov et al. 2007). La CL-15 est faiblement exprimée et se localise uniquement au niveau des cryptes. Cette distribution non homogène de l'expression des claudines peut être liée à la différenciation cellulaire, au métabolisme des glucides et aux facteurs de transcription.

Certains facteurs tels que HNF1 $\alpha$ , Cdx2 et GATA-4 ont été décrits en 2005 (Escaffit, Boudreau, et Beaulieu 2005). Les CL- 2, 3, 7 et 15 sont les plus exprimées. Le taux d'expression de CL-8 augmente progressivement de l'intestin grêle vers le côlon, tandis que celui de la CL-15 diminue dans ce même sens.

Les claudines ont des propriétés aux actions contraires. Elles remplissent non seulement une fonction de barrière, mais aussi un rôle de canal membranaire. Le rôle de barrière est conféré par l'augmentation des jonctions serrées tandis que le rôle de canal intervient avec la formation de pores membranaires. Alors que les jonctions serrées augmentent la résistance transépithéliale, à l'inverse les pores augmentent le flux d'ions et donc diminuent la résistance transépithéliale. L'équilibre de perméabilité de la barrière est donc soumis à une régulation spécifique des claudines. Il est important de distinguer une augmentation du flux engendrée par la régulation des claudines d'une augmentation liée à une fuite paracellulaire non spécifique. Le maintien de la barrière est réalisé grâce aux différentes isoformes des claudines (Tableau 1).

Les CL-2, 10b et 15 forment des pores spécifiques des cations tandis que les CL-10a et 17 forment des pores spécifiques des anions (Colegio et al. 2002 ; C. M. Van Itallie et al. 2006). Néanmoins, il peut être difficile de classer les claudines puisque la spécificité peut dépendre du type cellulaire.

Les claudines sont soumises à différents niveaux de régulation (transcription, post-traduction) et les interactions CIS au sein de la même membrane ou TRANS avec la membrane voisine déterminent l'assemblage, le remodelage, la modulation et la dégradation des jonctions serrées. Si nous prenons l'exemple de la CL-1, les modifications post-traductionnelles possibles sont : la phosphorylation (par les MAP kinase, aPKC et PKA), la déphosphorylation (par PP2A), la O-glycosylation au niveau du COOH cytoplasmique, la palmitoylation sur la boucle cytoplasmique, la N-glycosylation et l'ubiquitination, bien que cette dernière modification soit discutée pour la CL-1 (Fujibe et al. 2004 ; Butt et al. 2012 ; Asaka et al. 2011 ; Takahashi et al. 2009).

A ces claudines et occludines sont liées d'autres protéines. Les JAM, peu présentes au niveau de la barrière intestinale, sont plutôt retrouvées dans la barrière endothéliale. Elles régulent la migration des monocytes au travers des cellules endothéliales (Kakogiannos et al.

2020). Les barrières intestinale et endothéliale sont intimement liées puisque l'objectif du passage des nutriments au travers de l'épithélium est de rejoindre les autres organes via la circulation sanguine. La spécificité des protéines de jonction est primordiale dans le rôle barrière que le tissu effectue.

**Tableau 1.** Caractéristiques de perméabilité aux ions des isoformes de claudines. *Tableau de Günzel et Yu 2013.*

<sup>a</sup>Agit comme une barrière de Cl<sup>-</sup> dans les cellules MDCK II, mais comme un canal Na<sup>+</sup> dans les cellules LLC-PK1, MDCK I et dans l'intestin de la souris. <sup>b</sup>Des données contradictoires suggèrent également que la CL-19 peut agir comme une barrière Na<sup>+</sup>. <sup>c</sup>Agit comme une barrière Na<sup>+</sup> dans MDCK II, mais comme un pore de Cl<sup>-</sup> dans les cellules LLC-PK1 et/ou les cellules du canal collecteur.

Claudines spécifiques des cations	Références	Claudines spécifiques des anions	Références
<i>Fonction dominante formation des pores (↗ de la perméabilité)</i>			
Claudine 2	(Amasheh et al. 2002 ; A. S. L. Yu et al. 2009)	Claudine 7	(J. Hou et al. 2006)
Claudine 10b	(C. M. Van Itallie et al. 2006)	Claudine 10a	(C. M. Van Itallie et al. 2006)
Claudine 15 <sup>a</sup>	(Colegio et al. 2002 ; Tamura et al. 2011)	Claudine 17	(Krug et al. 2012)
<i>Fonction dominante formation de la barrière (↘ de la perméabilité)</i>			
Claudine 7	(Alexandre et al. 2007 ; Alexandre, Lu, et Chen 2005)	Claudine 1	(Inai, Kobayashi, et Shibata 1999, 1; McCarthy et al. 2000)
Claudine 19 <sup>b</sup>	(J. Hou et al. 2008)	Claudine 3	(Milatz et al. 2010)
		Claudine 4 <sup>c</sup>	(J. Hou et al. 2006)
		Claudine 5	(J. Hou et al. 2010 ; C. M. Van Itallie, Fanning, et Anderson 2003)
		Claudine 6	(Sas et al. 2008)
		Claudine 8 <sup>c</sup>	(A. S. L. Yu et al. 2003 ; Angelow, Schneeberger, et Yu 2007)
		Claudine 9	(Sas et al. 2008)
		Claudine 11 <sup>c</sup>	(C. M. Van Itallie, Fanning, et Anderson 2003)
		Claudine 14	(Ben-Yosef et al. 2003)
		Claudine 18-2	(Jovov et al. 2007)

Les protéines Crumbs font partie d'un complexe regroupant un domaine transmembranaire dont la partie cytoplasmique se termine par un motif PDZ lié à PALS-1. Trois familles de Crumbs existent Crb1, Crb2 et Crb3, mais seule la protéine Crb3 est associée aux JS de l'intestin. Crb3 est retrouvée au niveau des membranes apicales (Whiteman et al. 2014).

Une augmentation de l'expression de Crb3 est constatée lors de la transition du mésenchyme en épithélium et au contraire est diminuée dans la transition inverse. Une transition épithélio-mésenchymateuse désigne le passage d'un groupe de cellules épithéliales à une forme mésenchymateuse au cours de laquelle les cellules perdent leur capacité d'adhésion avec les cellules voisines (diminution de l'expression des cadhérines) et acquièrent des propriétés adhésives nouvelles vis-à-vis de la matrice extracellulaire (expression de nouvelles intégrines) (Sipos et Galamb 2012). Cela se produit lors de développement de pathologies cancéreuses. Les cellules vont dégrader au cours du processus la lame basale qui borde l'épithélium grâce à la sécrétion de métalloprotéinases. Cette transition épithélio-mésenchymateuse est caractérisée par un taux important de marqueurs épithéliaux comme l'E-cadhérine (E-cad) et EpCAM, et de marqueurs mésenchymateux tels que la Vimentine et N-cadhérine (Krawczyk et al. 2014). Une sur-expression ou sous-expression de Crb3 conduit à une désorganisation de la barrière épithéliale.

Les Zonula Occludens existent sous 3 formes ZO-1, ZO-2 et ZO-3. Elles sont toutes en interaction directe avec la F-actine (Odenwald et Turner 2013). Elles sont connues pour être impliquées dans la morphogenèse des tissus, le maintien de la structure apicale et la régulation de plusieurs barrières (Fanning, Ma, et Anderson 2002). Dans le cas de la barrière intestinale, les protéines ZO sont essentielles dans le processus de formation des TJ puisqu'elles agissent par association avec les claudines, OCLN et JAM via leur domaine PDZ (Otani et al. 2019 ; Itoh et al. 1999). A l'exception des CL-13, CL-22 et CL-23, toutes les claudines interagissent avec ZO-1. Les CL-1 à 4, CL-7 à 10, CL-14, CL-15, CL-18, et CL-19b sont liées à ZO-2 et seule la CL-3 est connue pour interagir avec ZO-3 (Günzel et Yu 2013). Les occludines et les tricellulines interagissent également avec ZO-1. Les spécificités de liaison ne sont pas encore élucidées, car MARVELD3, une protéine du complexe TAMP (OCLN, tricelluline et MARVELD3) qui peut se lier individuellement à l'OCLN et à la tricelluline, ne s'associe pas à ZO-3 par exemple (Raleigh et al. 2010 ; Günzel et Fromm 2012).

*Les jonctions adhérentes*\_ Ce type de jonction initie et maintient l'adhésion cellule-cellule. De plus, les jonctions adhérentes (JA) participent à la signalisation cellulaire et la régulation de la transcription des gènes (Takeichi 2014). Les membres de la famille des cadhérines partagent des caractéristiques structurelles communes : une partie cytoplasmique en C terminale, une

partie transmembranaire et une partie extracellulaire en N terminale. La région extracellulaire est composée de cinq domaines répétitifs d'environ 110 résidus d'AA.

Les cadhérines sont classées en deux sous-familles de type I ( E, B, N, P, R et M-cadhérine) et de type II (DE, F, K, OB, VE-cadhérine) (Nollet, Kools, et van Roy 2000). Ce classement se fait en fonction de la forte homologie du domaine EC1 en N terminale. D'autres cadhérines telles que la cadhérine-5, l'OB-cadhérine et la M-cadhérine possèdent une structure similaire, mais un domaine N terminal moins bien conservé (Kemler 1992). Au niveau intestinal, la principale cadhérine retrouvée est la E-cad. La LI-cadhérine ou cadhérine 17 sont impliquées dans les contacts intercellulaires flexibles en dehors des complexes jonctionnels (Baumgartner 2013).

Les cadhérines sont des protéines transmembranaires qui engagent des liaisons dépendantes du calcium avec les cadhérines de la cellule d'en face (Shapiro et Weis 2009). La région intracellulaire des cadhérines se lie à l' $\alpha$ -caténine. Ce complexe cadhérine-caténine s'associe également aux microtubules et à la F-actine. Les JA régulent donc l'organisation du cytosquelette d'actine des cellules (Buckley et al. 2014).

Des chaînes d'interaction en cascade agissent pour réguler la transition entre de nouveaux contacts et des interactions matures déjà existantes. Par exemple la nectine, une molécule d'adhésion de type immunoglobuline, indépendante du calcium, se lie à l'afadine, qui elle-même se lie à  $\alpha$ -caténine et ZO-1 (Yamamoto et al. 1997). Cette chaîne séquentielle est liée au cytosquelette d'actine. Ce complexe à base de nectine s'associe d'abord pour former les premières interfaces cellule-cellule, puis il participe au recrutement du complexe cadhérine-caténine qui formera la jonction adhérente mature et stable (Tachibana et al. 2000 ; Yamamoto et al. 1997).

La E-cad mature, appartient au sous-type I, elle est composée d'un domaine transmembranaire unique, d'un domaine cytoplasmique de 150 AA et d'un domaine extracellulaire de 550 AA comprenant 5 domaines répétés en tandem. L'existence d'un complexe E-cad/ $\beta$ -caténine/ $\alpha$ -caténine a été décrit (Gayrard et Borghi 2018 ; Thomas et al. 2013). Ce complexe est lié à l'actine par un domaine particulier appelé VH3 (vinculin homology domain 3) dans la partie C-terminale de l' $\alpha$ -caténine. Des études ont montré qu'une inactivation de la E-cad entraînait des mutations cellulaires à l'origine de cancers sporadiques particuliers (cancers gastriques diffus héréditaires) (Becker et al. 1994). La perte d'expression

de la E-cad dans des lignées cellulaires et des tissus tumoraux semble associée à l'expression de cadhérines mésoenchymateuses, telles que la N-cadhérine et la cadhérine 11. Ce phénomène est généralement appelé "commutation de cadhérine". La commutation des cadhérines se produit pendant le développement embryonnaire, la morphogenèse des tissus, et la progression de cancer (Halbleib et Nelson 2006). La N-cadhérine interagit avec un récepteur qui favorise la survie, la migration et l'invasion des cellules (Suyama et al. 2002). D'autres enzymes comme les calpaïnes et les caspases bloquent la formation des jonctions d'adhérence en clivant l'E-cad en amont du domaine de liaison de la  $\beta$ -caténine (Rios-Doria et al. 2003).

*Les desmosomes et hemi-desmosomes*\_ Les desmosomes en forme de disque sont des jonctions d'adhérences particulières qui permettent l'adhésion de 2 cellules ensemble en couplant les interactions des cadhérines et des filaments intermédiaires du réseau cytosquelettique des cellules (Odenwald et Turner 2013). Les cadhérines desmosomales participent à la structure des desmosomes et hemi-desmosomes. Les desmoglénines et desmocollines sont des glycoprotéines étroitement liées à la molécule de la jonction d'adhérence  $\beta$ -caténine (Choi et al. 2009). Une diminution ou une perte d'expression de ces glycoprotéines peuvent être responsables de développements métastatiques (L. Wang et al. 2007). La Desmoglénine-2 et la Desmocolline-2 qui contribuent à l'homéostasie des muqueuses ont montré leur importance dans la cicatrisation de la muqueuse intestinale (Flemming et al. 2020). Les desmosomes sont principalement localisés sur les faces latérales sous les jonctions serrées afin d'en renforcer les effets (Kottke, Delva, et Kowalczyk 2006). Les hémidesmosomes ne sont pas présents sur la partie latérale des cellules, ils ont plutôt vocation à favoriser l'adhésion des cellules à la lame basale. Pendant les premiers jours de leur formation, les desmosomes sont dépendants du calcium extracellulaire pour rester au niveau de la membrane plasmique, puis après maturation, ils acquièrent une capacité d'hyper adhésion sans être dépendants du calcium cette fois (Garrod et Kimura 2008).

*Les jonctions communicantes*\_ Ces canaux permettent la circulation libre de nutriments, molécules et ions de masses inférieures à 1 kDa entre 2 cellules adjacentes (Hervé et Derangeon 2013). La mise en relation des cytoplasmes est possible grâce à des pores formés de protéines transmembranaires appelées connexines au niveau basolatéral. Ces jonctions communicantes entre cellules participent à la communication cellulaire. Elles sont

indispensables à la croissance et la différenciation cellulaires ce qui signifie qu'un défaut de ces jonctions peut perturber les processus biologiques (Wiener, Spiro, et Loewenstein 1964). Trois familles de protéines formant ces pores ont été identifiées à savoir : les innexines, les connexines et les pannexines (Beyer et Berthoud 2018). Très peu présentes dans l'intestin grêle, les jonctions communicantes sont surtout localisées dans la cavité buccale. Elles sont résistantes aux nombreux stress induits par les contraintes mécaniques et les agents environnementaux (Groeger et Meyle 2015).

### **3.4. Le stress et la barrière intestinale**

Le stress cellulaire est l'ensemble des réponses émises par une cellule pour répondre à un signal d'alerte provoqué par l'environnement. Dans le cas où la réponse est positive la cellule est protégée de toute dégradation, dans le cas où la réponse est négative elle peut alors conduire à la mort cellulaire afin de protéger les cellules voisines. Entre la survie et la mort cellulaire, de nombreux signaux vont être générés en intracytoplasmique pour s'adapter et lutter avant d'en arriver à l'apoptose.

#### *3.4.1. Les mécanismes de protection cellulaires*

L'Encyclopédie de Neurosciences en 2009 définit le stress cellulaire comme « la réaction de la cellule à toute condition environnementale défavorable qui perturbe l'homéostasie cellulaire, avec des dommages macromoléculaires potentiels, c'est-à-dire des atteintes aux protéines, à l'ADN, à l'ARN et aux lipides ». Pour lutter contre ces dommages, différents mécanismes de réponse sont déployés.

**Stress oxydatif** \_ Un des mécanismes de protection les plus connus vis-à-vis d'un stress environnemental est la production d'agent qui neutralise les espèces réactives de l'oxygène (ROS). La famille des ROS est chimiquement instable et ils sont créés par perte d'électron lors de la production d'énergie par la chaîne respiratoire et le cycle de Krebs. Comme tous les membres de la famille des ROS sont constitués d'oxygène, ce dernier va fixer les électrons et conduire à la formation d'anions superoxydes, de peroxydes d'hydrogène, de radicaux hydroxyles et d'oxygènes singulets (Figure 8).

Ces ROS vont agir sur les lipides, les protéines et l'ADN causant de graves dommages aux cellules. En temps normal l'intestin sait lutter efficacement contre le stress oxydatif, mais avec

le vieillissement ou d'autres facteurs de stress, les défenses ne suffisent plus et contribuent au développement de pathologies intestinales (Rani et al. 2016). Heureusement, des agents antioxydants aident à prévenir ces dommages au niveau intestinal (Diaz de Barboza et al. 2017). La vitamine E est un antioxydant qui protège les lipides de la membrane en bloquant la production de ROS (Miyazawa et al. 2019). La superoxyde dismutase (SOD), les peroxydases et les catalases détruisent les ROS en les transformant en eau à la suite de réactions successives (Weydert et Cullen 2010).

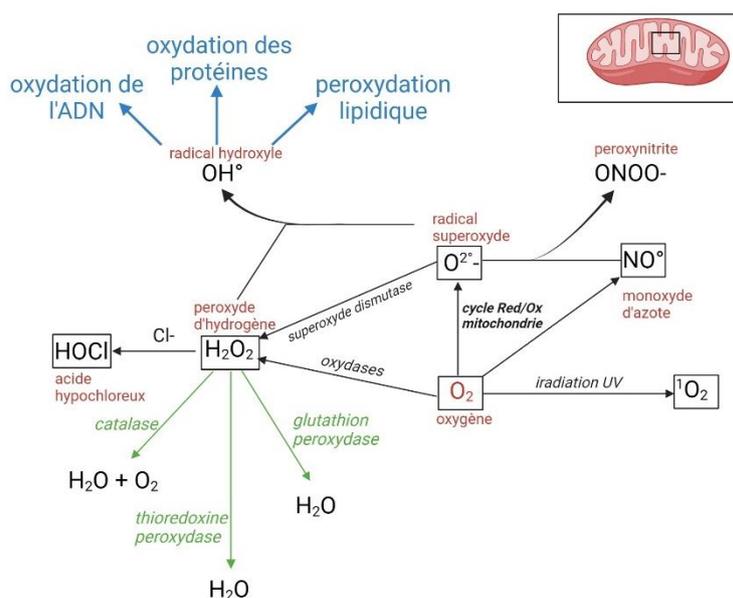


Figure 8. Production et élimination des ROS. Figure inspirée de Djouadi et Lanez 2021

**Stress thermique**\_ Un stress de nature thermique « heat shock » comme une augmentation de la température provoque une augmentation de la production de protéines chaperon et de protéases, dont la fonction est d'empêcher le mauvais repliement des protéines (Figure 9). Le mécanisme de défense contre le stress thermique commence par la mise en pause de la transcription et de la traduction des gènes afin d'éviter la production de protéines avec une mauvaise conformation. Puis des facteurs de transcription HSF (heat shock factors) vont activer la synthèse de protéines Hsps (Jolly et Morimoto 2000). Les Hsps jouent le rôle de régulateurs de l'inflammation en diminuant la production de cytokines par les voies NF- $\kappa$ B et « mitogen-activated protein kinase » (MAPK) (Malago, Koninkx, et van Dijk 2002). D'autres formes de stress peuvent aussi activer les Hsps. C'est le cas des stress environnementaux comme les oxydants, métaux lourds, xénobiotiques qui provoquent des dommages dans les

repliements (Akerfelt, Morimoto, et Sistonen 2010). La cytoprotection induite par la réponse au choc thermique participe au maintien de la fonction épithéliale intestinale stable (Malago, Koninkx, et van Dijk 2002).

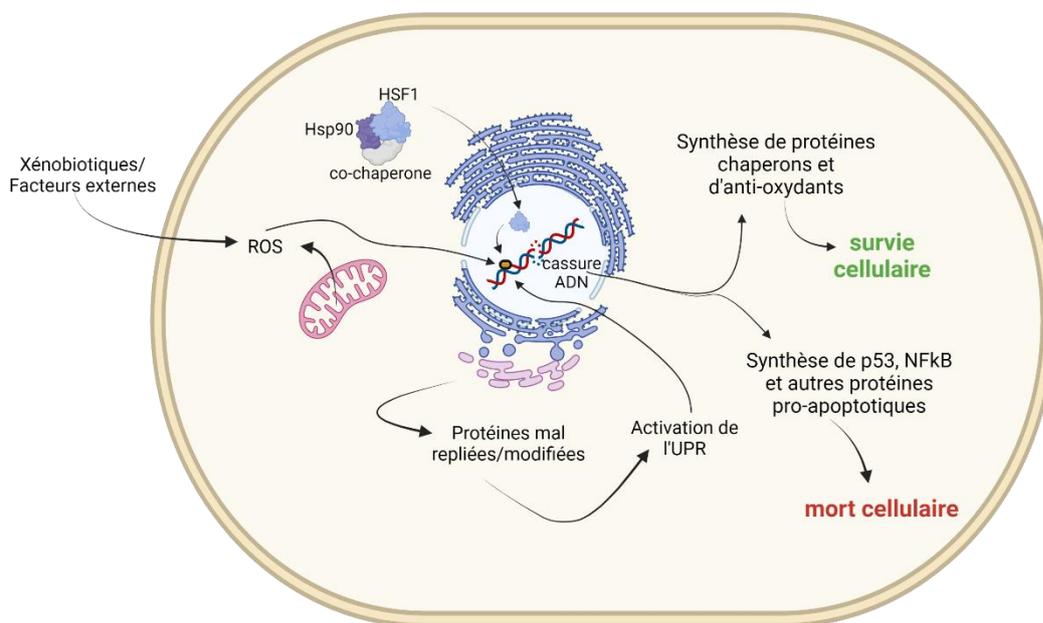


Figure 9. Entre survie et mort cellulaire. Les mécanismes de protection face aux stress environnementaux

**Stress métabolique**\_ Pour que les protéines soient fonctionnelles, elles nécessitent souvent des modifications post-traditionnelles telles que les glycosylations ou la formation de ponts disulfures dans le réticulum endoplasmique (RE) des cellules. Cette organelle est sensible aux stress métaboliques (diminution calorique, perte en oxygène) et met en place une réponse nommée UPR « unfolded protein response » (Hetz, Zhang, et Kaufman 2020). L'activation de l'UPR a un impact sur presque tous les aspects de la voie sécrétoire : synthèse, translocation, repliement, maturation, contrôle de la qualité, trafic des protéines et l'élimination de celles n'ayant pas la bonne conformation. Cette voie de signalisation UPR est présente sous forme inactive dans des conditions physiologiques et s'active lors d'un stress cellulaire. La réponse se traduit par la production de protéines chaperons et d'antioxydants. Le RE a un rôle important dans la modulation du repliement protéique. S'il est capable de s'adapter en produisant plus de facteurs IRE-1, la survie cellulaire est alors possible. Dans le cas contraire, l'accumulation de protéines dépliées ou mal repliées dans la lumière du RE favorisera la mort

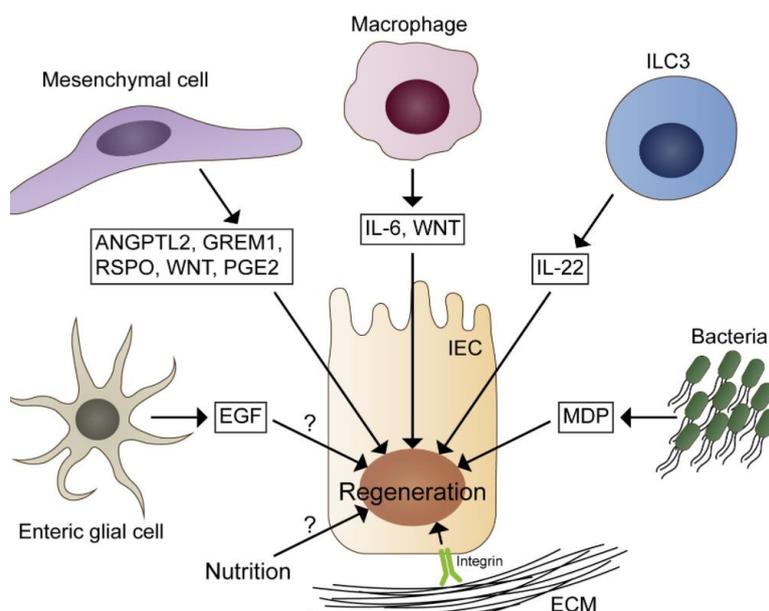
cellulaire. Dans ce sens, des études ont associé le stress du RE et l'UPR à des maladies inflammatoires de l'intestin et au cancer colorectal (Coleman et Haller 2019).

**Stress chimique**\_ Les stress environnementaux ont un impact au niveau génétique entraînant également des erreurs dans la biogenèse des protéines (Guisbert et al. 2013). Un stress de nature chimique (irradiation, intercalant, UV) met à l'épreuve l'ADN sous sa forme monobrin durant les périodes de transcription. Les cellules possèdent un système de réparation de l'ADN compétent, mais parfois les cassures étant trop importantes, l'induction de nouvelles voies de signalisation par le biais de p53 et NF-κB est le dernier recours. Ces deux facteurs de transcription p53 et NF-κB répondent respectivement à des stress intrinsèques et extrinsèques et agissent de façon opposée sur les cellules (Ak et Levine 2010). Afin d'éliminer et fournir une réponse immunitaire durable, les cellules intestinales M reconnaissent le xénobiotique pathogène et expriment des récepteurs antigéniques à leur surface qui serviront à la spécificité de l'immunité adaptative (lymphocytes mémoires). La division cellulaire des clones de cellules immunitaires est alors soumise au facteur de transcription NF-κB. Puisque la division et la croissance cellulaire sont aussi responsables de développements de cancers colorectaux, NF-κB peut dans certain cas devenir oncogène (Ryan et al. 2000). Des lésions de l'ADN entraînent l'activation de p53, un gène décrit comme suppresseur de tumeurs. Ce gène déclenche l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose ou la sénescence, et évite par conséquent le développement de clones mutés (Gomes et al. 2018 ; Leszczynska et al. 2015).

**La mort cellulaire**\_ L'épithélium du tube digestif est exposé à divers facteurs de stress. Lorsque l'atteinte est trop importante la survie n'est plus possible et la cellule meurt. Une mort cellulaire excessive a été associée à une inflammation chronique chez les patients de la maladie de Crohn et de la colite ulcéreuse (Larabi, Barnich, et Nguyen 2020). Les signaux de mort cellulaire sont régulés par différents mécanismes comme l'apoptose, l'autophagie et la nécrose. Contrairement à l'apoptose auto-induite par la cellule, la nécrose n'est pas programmée et échappe au contrôle cellulaire. Elle est néfaste, car l'accumulation de produits cellulaires dans l'espace extracellulaire entraîne une forte inflammation et les macrophages ne peuvent pas éliminer les nombreux fragments générés. L'autophagie est le troisième type de mort cellulaire. Il se caractérise par une destruction d'éléments cellulaires en intracytoplasmique, il représente le système de recyclage de la cellule. Plus récemment, une

autre régulation de la mort cellulaire nommée nécroptose a été décrite pour les cellules épithéliales intestinale (Günther et al. 2013 ; Negroni et al. 2020).

**Régénération cellulaire**\_ Lors d'un dommage causé au niveau des cryptes intestinales par un agent pathogène viral ou bactérien, la barrière produit transitoirement des cellules épithéliales associées à la plaie (WAE) (Miyoshi et al. 2012). Les WAE ne possèdent pas toutes les fonctionnalités d'un entérocyte. Elles limitent la désorganisation de la barrière, en remplaçant les entérocytes, et donc évitent une plus grande effraction des pathogènes. Le microenvironnement des cellules épithéliales intestinales, telles que les cellules mésenchymateuses et les cellules immunitaires, devient plus abondant après un dommage (Figure 10). Ces cellules sécrètent des molécules de signalisation (Wnt, Notch, YAP, etc) qui favorisent le processus de régénération de la barrière intestinale (Hageman et al. 2020).



**Figure 10.** Interaction entre l'épithélium intestinal et les composants non épithéliaux qui modulent la régénération. *Figure de Hageman et al. 2020*

### 3.4.2. Les altérations de la perméabilité intestinale

Lorsque la barrière saine subit un stress, les cellules intestinales et leurs protéines de jonction sont impactées. Le dialogue qui existe entre ces cellules et le microbiote est fragilisé (Figure 11). Des modifications des protéines de jonctions ou de la composition en micro-organismes dans notre intestin, même transitoires, peuvent être à l'origine d'une augmentation de la perméabilité et conduire à la survenue de pathologies. La perméabilité de

l'intestin peut être modulée indirectement par les bactéries suite à la libération de peptides ou de toxines solubles et par des métabolites ou bien directement par les cellules intestinales (Ewaschuk et al. 2008).

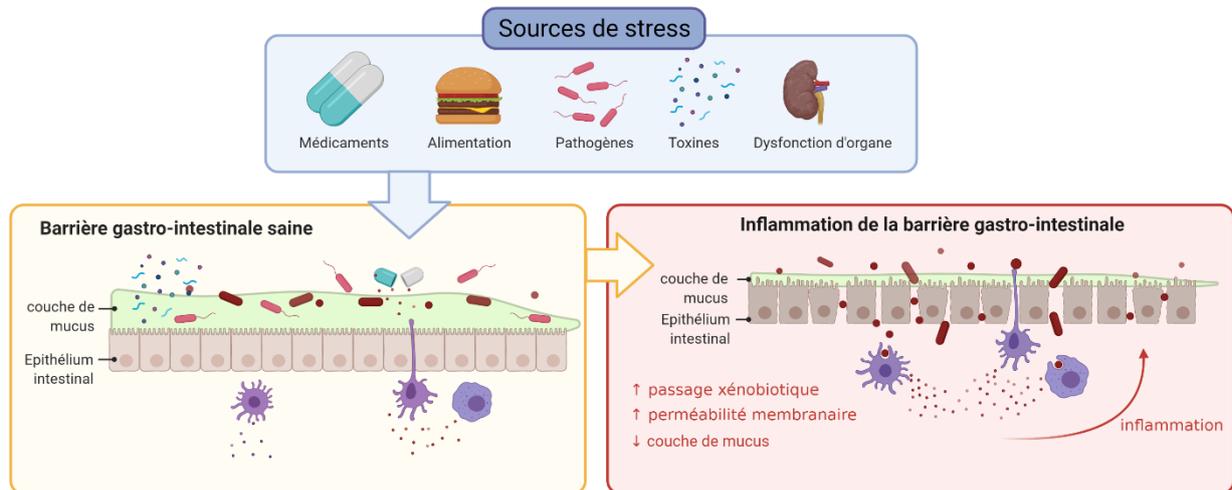


Figure 11. Causes et conséquences de l'inflammation chronique de l'intestin

**Maladies inflammatoires**\_ La densité des jonctions de communication épithéliales est significativement plus élevée chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) que chez les témoins (J. J. Liu et al. 2011). Une dysfonction primaire de la barrière intestinale ne suffit pas pour provoquer une maladie intestinale inflammatoire. La dysfonction active substantiellement les réponses immunitaires de la muqueuse et accélère le processus de colite à la suite d'une régulation anormale des jonctions serrées (Su et al. 2009). Le LPS des bactéries Gram négatifs ont montré leur implication dans la réponse inflammatoire. Une action spécifique est exercée sur les cellules en fonction du sérotype avec notamment l'activation des médiateurs TNF- $\alpha$  et IL-10 (Stephens et von der Weid 2020)

**Maladie cœliaque**\_ les personnes sensibles au gluten même en faible quantité sont atteintes d'une augmentation de la perméabilité (Duerksen, Wilhelm-Boyles, et Parry 2005). Cette perméabilité anormale s'accompagne d'un taux sérique élevé de zonuline et d'une quantité accrue de récepteurs CXCR3 (Lammers et al. 2008).

**Syndrome de l'intestin irritable**\_ L'hyperperméabilité intestinale peut favoriser des syndromes de malabsorption de minéraux et de nutriments comme le zinc, le fer et la vitamine B12 (M. S. Steiner et Morton 1991).

**Cancers colorectaux\_** Plusieurs cancers sont associés à une perte de la polarité cellulaire et à la dissociation des jonctions serrées. Par exemple, la CL-1 est fortement exprimée dans les cancers colorectaux (Gowrikumar et al. 2019).

**Les maladies liées à une dysbiose du microbiote\_** La transplantation du microbiote d'un patient obèse chez une souris a rendu la souris obèse à son tour. L'obésité est donc associée à une baisse de la diversité des espèces bactériennes du microbiote intestinal (Gérard 2016). Les patients atteints de diabète de type 2 ont montré un changement de composition bactérienne (Sabatino et al. 2017). Il serait possible de donner des prébiotiques pour améliorer le contrôle glycémique de patients avec un diabète de type-1 (Ho et al. 2019). Outre l'impact du microbiote sur des troubles métaboliques, des études récentes ont montré son implication dans des maladies neurodégénératives. Le microbiote intestinal peut moduler la fonction cérébrale via l'axe microbiote-intestin-cerveau. Il en résulte qu'un déséquilibre du microbiote peut jouer sur les troubles cognitifs et l'apparition de la maladie d'Alzheimer (Hu, Wang, et Jin 2016). De plus, une dérégulation de l'axe microbiote-intestin-cerveau dans la maladie de Parkinson pourrait être à la base des dysfonctionnements gastro-intestinaux qui apparaissent plusieurs années avant le diagnostic (Caputi et Giron 2018). L'augmentation du biomarqueur de perméabilité membranaire zonuline semble être impliquée dans la stimulation de l'anxiété et de la dépression (Stevens et al. 2018). La théorie selon laquelle le processus pathologique se propage de l'intestin au cerveau se renforce avec la suspicion d'un lien entre le syndrome autistique et le microbiote. 30 à 50 % des enfants atteints d'autisme présentent également des problèmes gastro-intestinaux. Des transplantations de microbiote fécal ont été réalisées sur des enfants autistes par une équipe de l'université d'Arizona, leur étude indique qu'ils auraient réduit de 45 % le spectre autistique chez ces enfants (Kang et al. 2019).

**Maladies infectieuses\_** Une dysbiose de la flore microbienne entraîne un manque de signalisation pour maintenir la fonction de barrière (Fukuda et al. 2011). La toxine de Zonula Occludens qui peut être produite par le microbiote module les jonctions serrées par une réorganisation de l'actine (Fasano et al. 2000). Par exemple, la toxine d'*Helicobacter pylori* provoque une augmentation de la perméabilité paracellulaire des cellules intestinales en inactivant la kinase Par1/MARK. En conséquence, la fonction de barrière de l'épithélium gastrique se détériore et les microvillosités disparaissent. Le microbiote peut jouer également

sur la perméabilité épithéliale par le biais d'effets sur les cellules immunitaires de l'hôte et la libération de cytokines. L'action de libération de cytokines peut aussi bien augmenter la perméabilité (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) ou améliorer la fonction de barrière (TGF $\beta$ , IL-10) (Miyakawa et al. 2020; Anuradha et al. 2016).

Il est difficile d'affirmer que les bactéries sont à l'origine de l'altération de la barrière intestinale, l'enjeu est de déterminer si la dysbiose est une cause ou une conséquence de l'altération de la barrière intestinale. La compréhension des modifications de protéines de jonction est donc primordiale pour évaluer leur impact sur les pathologies. Les épithéliums intestinaux déficients en E-cad présentent une perte de CL-1, ce qui indique non seulement un défaut du transport transcellulaire, mais également une perturbation des voies de transport paracellulaires. À l'inverse, la surexpression de l'E-cad au sein de l'épithélium intestinal retarde la migration des cellules de la crypte vers les villosités. Cet impact est conséquent puisqu'il freine la prolifération et induit une apoptose importante au fond des cryptes. L'apoptose retarde la différenciation des cellules souches en entérocytes et donc diminue le nombre de cellules épithéliales capable d'absorption (Hermiston et Gordon 1995).

L'environnement et les xénobiotiques avec lesquels nous rentrons en contact sont des facteurs non négligeables à prendre en compte dans la pathogénèse. Après avoir vu les conséquences produites sur notre système digestif et les atteintes qu'ils occasionnent de l'échelle subcellulaire à tissulaire, nous allons investiguer plus en détail les types de xénobiotiques auxquels nous sommes confrontés au quotidien.

## Chapitre 2 : Qui sont ces xénobiotiques ?

De nombreuses molécules traversent notre intestin, et peuvent engendrer des réactions physiologiques pouvant altérer la fonction et l'organisation cellulaire intestinales. Dans la plupart des cas les xénobiotiques sont considérés comme des molécules indésirables pour notre organisme (micro-organismes pathogènes, toxines, polluants) responsables de pathologies chroniques. Or certaines participent, au contraire, au retour de l'équilibre de notre barrière intestinale (médicaments, plantes, etc.).

### 1. Les médicaments : ces xénobiotiques volontairement assimilés

#### 1.1. Les molécules conventionnelles

Le développement d'agents thérapeutiques contre les pathologies chroniques de l'intestin et les cancers du tube digestif est un défi important pour la société actuelle. Les plantes ont, en premier, été considérées comme le remède pour supprimer les symptômes. Puis l'introduction de la notion de principe actif a suggéré l'idée d'un médicament spécifique à chaque maladie. Les molécules chimiques, grâce à leur petite taille, peuvent facilement être administrées par voie orale, ce qui n'est pas le cas des grosses biomolécules comme les anticorps. Or ces dernières présentent des atouts de rapidité et spécificité d'action. En développant des biomolécules alternatives aux anticorps, de nouvelles classes de protéines thérapeutiques, ont permis d'allier petite taille et spécificité d'action. Dans cette partie nous allons effectuer une brève revue des molécules thérapeutiques afin de distinguer les spécificités de chaque classe de molécules (molécules chimiques, anticorps, fragments d'anticorps et protéines d'échafaudages).

##### 1.1.1. Les petites molécules chimiques

Administrées majoritairement par la voie orale sous forme de sirop, poudre, comprimés, les molécules synthétisées chimiquement ou extraites de plantes sont facilement absorbées par l'intestin. Leur petite taille (inférieure à 1000 Da) leur permet de pénétrer dans les cellules et facilite l'interaction avec la cible biologique intracellulaire. La plupart de ces molécules sont non immunogènes et sont rapidement éliminées de l'organisme par métabolisation. Cependant, ces molécules présentent un risque de toxicité spécifique au principe actif ou à

ses métabolites. La compréhension des mécanismes d'action est une phase importante pour connaître les effets pharmacologiques qu'ils vont induire. Certaines molécules chimiques vont avoir des effets physiques, modifier la consistance ou le temps de transit, d'autres vont se lier à des récepteurs, enzymes ou canaux ioniques. La plupart du temps, ces molécules ont un effet inhibiteur (Zhou et al. 2019).

Les traitements par les molécules chimiques contre les MICI ont d'abord été les corticoïdes et les immunosuppresseurs (azathioprine, 6-mercaptopurine et méthotrexate). Le suivi des malades a montré que la majorité des patients ayant eu une MICI ont développé un cancer qui pouvait être lié à l'utilisation de ces traitements (Pithadia et Jain 2011).

Les traitements du cancer ont pour objectif d'entraîner la mort des cellules tumorales. Les actions sur les enzymes sont également recherchées pour bloquer la progression des cancers. Dans le cas du cancer colorectal, la chirurgie constitue le traitement de référence et peut être associée à de la chimiothérapie dans les cas les plus sévères. Néanmoins, les chimiothérapies ne sont pas spécifiques des tissus tumoraux et vont également agir sur les cellules saines (Johdi et Sukor 2020). C'est pourquoi, de nouvelles voies thérapeutiques s'appuient sur les caractéristiques de la tumeur et de son microenvironnement pour limiter l'exposition des tissus sains lors du passage du principe actif vers la zone pathologique.

### 1.1.2. Les Anticorps

Ces vingt dernières années, la recherche médicale s'est concentrée sur le développement de biomolécules telles que les anticorps monoclonaux (AcM). Les AcM sont des protéines d'affinité produites par le système immunitaire qui sont capables de reconnaître très spécifiquement une cible, ce qui font des anticorps un candidat médicament intéressant.

**Rôle des anticorps\_** Les anticorps sont des complexes glycoprotéiques aussi appelés « immunoglobuline » (Ig) faisant partie du système immunitaire. Certains xénobiotiques pathogènes peuvent être éliminés par phagocytose directement après complexation d'anticorps autour d'eux. Des anticorps neutralisants peuvent éliminer les cellules altérées par les xénobiotiques ou contenant les xénobiotiques en se fixant sur les antigènes spécifiquement exprimés à la surface des cellules (Megha et Mohanan 2021).

**Fonctions des anticorps\_** Les fonctions dépendent de deux zones fonctionnelles Fab (Fragment Antigen Binding) et Fc (Fragment cristallisable). La fraction Fab est responsable de

la reconnaissance de l'antigène. La fraction Fc a une fonction effectrice impliquée dans le transport de l'anticorps, l'activation du Complément et l'activation de la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) (N. A. Pereira et al. 2018; X. Wang, Mathieu, et Brezski 2018). Le fragment particulier FcRn chez l'adulte est impliqué dans le recyclage au niveau digestif des IgG, ce qui permet d'augmenter leur durée de vie dans un milieu riche en molécules du non-soi. L'anticorps est capable de réaliser des liaisons de différentes natures favorisant le couplage avec des toxines, cytokines, radioéléments, peptides, ce qui en fait un « véhicule » idéal pour amener le principe actif jusqu'à la cible (Birrer et al. 2019). Les AcM utilisés comme agents thérapeutiques couvrent de nombreux domaines de la médecine dont la transplantation, l'auto-immunité, l'allergie et les tumeurs (Böhmig et al. 2019; Wood 2017).

**Structure des anticorps**\_ Ces glycoprotéines sont composées de 4 chaînes polypeptidiques homologues deux à deux. D'un point de vue structure 3D, l'immunoglobuline est formée de 2 chaînes lourdes (heavy chain – H) et 2 chaînes légères (light chain – L). Les chaînes homologues sont reliées deux à deux par des ponts disulfures nommés chaînes intercaténares. Les chaînes lourdes et légères s'organisent en domaine de 110 AA environ reliés par des ponts disulfures intracaténares (G. Fan et Li 2018). La chaîne lourde possède 3 domaines constants (CH1, CH2 et CH3) et un domaine variable (VH) tandis que la chaîne légère ne possède qu'un domaine constant (CL) et domaine variable (VL). Ces domaines sont riches en sucres à l'exception du domaine CH2, ce qui le rend particulièrement flexible (Stanfield et Wilson 2014) (Figure 12).

La séquence CDR (complementarity determining regions) des domaines VH représente la zone d'interaction privilégiée de l'anticorps avec son antigène. Les liaisons Paratope (CDR de l'anticorps) – Epitope (CDR de l'antigène) sont des liaisons faibles réversibles de natures hydrogènes, non covalentes, hydrophobes ou électrostatiques. Un anticorps possède 2 paratopes identiques lui permettant de lier deux structures antigéniques identiques par anticorps (Fernández-Quintero et al. 2019).

Les anticorps thérapeutiques sont produits chez les mammifères, or la réponse immunitaire est responsable d'effets secondaires importants. Afin de pallier à ces problèmes d'immunogénicité non recherchés, des IgG chimériques puis humanisées ont été développées par la méthode d'hybridome créée en 1984 par Georges Köhler et César Milstein.

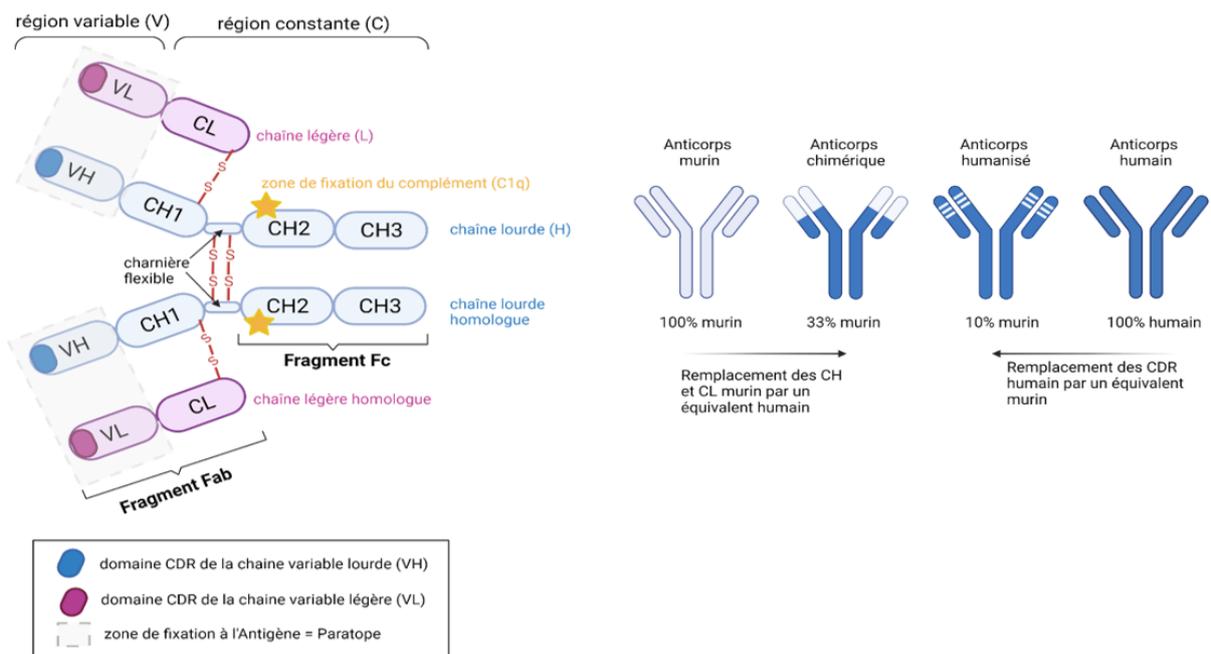


Figure 12. Structure et évolution des immunoglobulines. Figure inspirée de G. Fan et Li 2018

**Mécanisme d'action des anticorps**\_ La réponse immunitaire se découle en trois phases : la phase de reconnaissance et de fixation au xénobiotique quand cela est possible, la phase effectrice et la phase de recrutement de cellules immunocompétentes. La présence de domaines variables à l'extrémité des anticorps permet la fixation spécifique des antigènes (Kapingidza, Kowal, et Chruszcz 2020). Cette spécificité antigène-anticorps particulière s'effectue sur des récepteurs membranaires ou cellulaires de bactéries, virus, toxines afin d'en contrôler l'action. En se liant aux pathogènes, les anticorps peuvent alors neutraliser les effets délétères et favoriser leur élimination.

Une fois l'antigène du pathogène reconnu par la partie Fab, l'anticorps a pour objectif d'activer ses fonctions biologiques effectrices. La figure 13 détaille cette activation du Complément par la voie classique et lytique principalement utilisée pour éliminer les xénobiotiques pathogènes (Harboe et al. 2004).

L'utilisation d'AcM en thérapie n'est pas sans rencontrer des problèmes d'effets secondaires, d'efficacité non ciblée (leur haut poids moléculaire rend difficile la pénétration des tumeurs solides), de pharmacocinétique (demi-vie longue, faible élimination), économique (coût de développement très important) et de production (système eucaryote) (van Tetering et al. 2020). Les AcM sont des glycoprotéines complexes qui nécessitent des

modifications post-traductionnelles (glycosylation) qui ne peuvent être effectuées que chez les eucaryotes. Or, le rendement de production des eucaryotes est un frein pour une utilisation thérapeutique généralisée. C'est pourquoi, d'autres alternatives aux anticorps ont émergé ces dernières années.

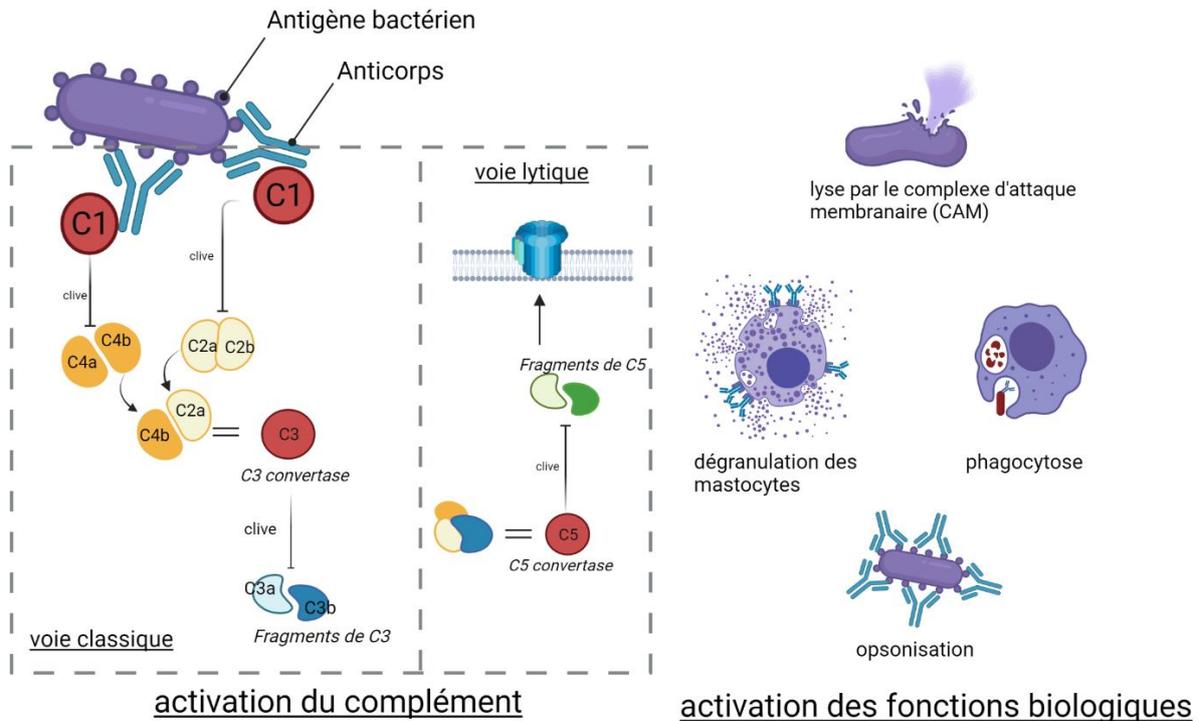


Figure 13. Activation du complément par la voie classique

Le vecteur idéal, pour dispenser un traitement, doit être éliminé rapidement de l'organisme et être retenu suffisamment longtemps au niveau de la cible pour que l'action puisse être délivrée. Majoritairement administré par voie intraveineuse, nous avons vu dans le premier chapitre que le médicament est soit filtré dans les reins (clairance rénale) soit métabolisé et filtré au niveau du foie (clairance hépatique). La clairance est désignée comme le temps nécessaire pour éliminer une substance de l'organisme. La filtration glomérulaire est soumise à la taille des molécules. Seules les molécules ayant un poids moléculaire compris entre 30 et 70 kDa pourront être éliminées sans devoir prolonger leur temps de circulation dans l'organisme pour être métabolisées. La diminution de la taille du vecteur est donc un point clé pour améliorer la clairance de la molécule. De nombreuses alternatives aux anticorps ont ainsi été créées selon ce principe.

## 1.2. Les protéines thérapeutiques alternatives

### 1.2.1. Les fragments d'anticorps

Les anticorps sont sensibles à certaines protéases comme la papaine et la trypsine. Une coupure entre les domaines CH1 et CH2 sépare les fractions Fc (50k Da) et les deux fragments Fab (55kDa). Les fragments Fab/fab' conservent leurs propriétés de reconnaissance et fixation à l'antigène tout en ayant une meilleure clairance sanguine puisque leur taille est diminuée. La réduction de taille réduit également le nombre de paratope disponible. Afin de garder la bivalence un fragment F(ab')<sub>2</sub> de 110 kDa et un fragment pFc' sont obtenus avec l'enzyme IdeS (enzyme dégradant les immunoglobulines de Streptococcus pyogenes). Les régions variables des chaînes lourdes et légères peuvent être isolées pour former un fragment variable Fv (28kDa), qui ne fait plus que la moitié de la taille du fragment Fab. Une modification de ce fragment en scFv lui permet d'avoir une chaîne en AA unique tout en conservant la spécificité originale de l'immunoglobuline mère. Il s'agit de la fusion des VL et VH reliés par un polypeptide.

Une fois que les fragments entrent dans la circulation sanguine, ils sont éliminés rapidement du fait de leur petite taille. Donc une ingénierie des anticorps a vu le jour pour conserver la faible taille et allonger la demi-vie dans le sang (Kontermann 2011). Il faut néanmoins prendre garde à ne pas diminuer l'affinité de liaison du fragment modifié. Les modifications des fragments pour apporter une meilleure affinité concernent surtout les CDR. Les méthodes de mutagenèse ciblée ou aléatoire génèrent des bibliothèques de CDR qu'il est possible de cribler pour sélectionner les CDR les plus affins aux antigènes (W. P. Yang et al. 1995). La région déterminant la complémentarité est constituée de 3 domaines (CDR1 à 3) (Schier et al. 1996). Améliorer la capacité de liaison augmente la spécificité de ciblage, ce qui redirige les cellules immunitaires vers les cellules infectées et donc améliore l'élimination des agents pathogènes.

Un autre moyen d'augmenter cette affinité est de doubler la spécificité de liaison ou des liaisons avec deux antigènes différents. Le fragment F(ab')<sub>2</sub> bispécifique offre la possibilité d'être lié à deux antigènes différents en modifiant la spécificité d'un des paratopes. Les minibodies (80 kDa), eux, sont constitués de deux scFv et du domaine CH3 liés par des ponts

disulfures ce qui permet d'être bispécifique et d'avoir une fonction effectrice (activation du Complément, ADCC) (Figure 14).

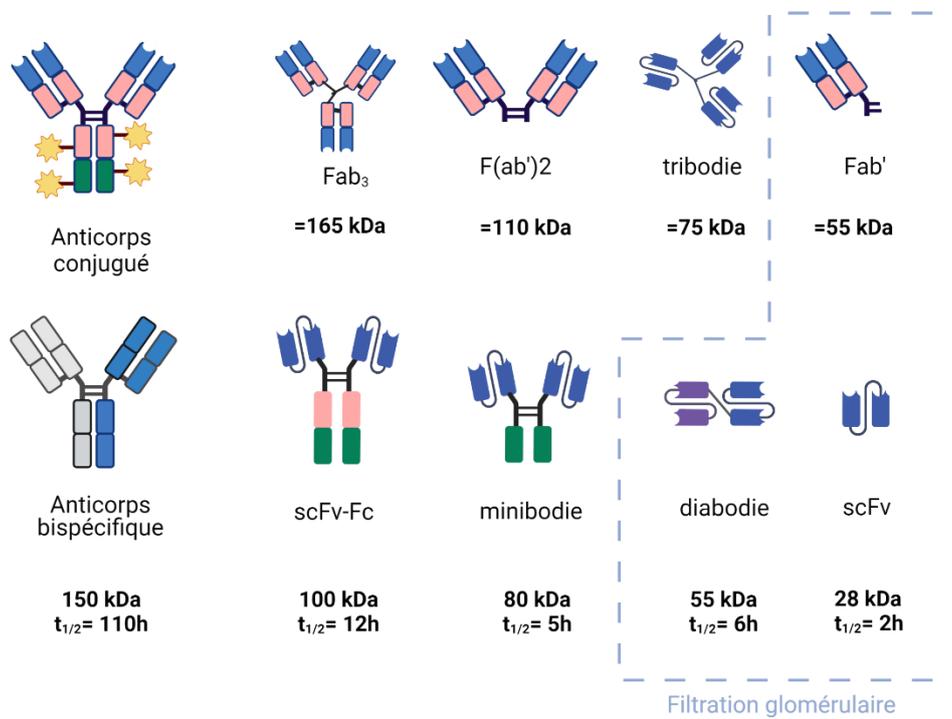


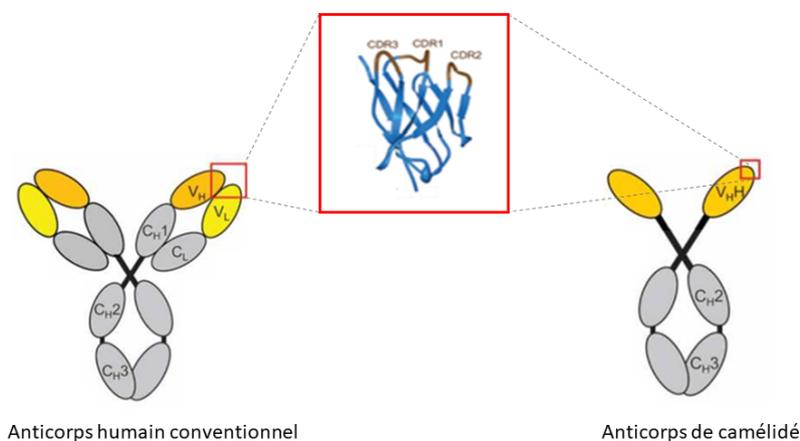
Figure 14. Structure schématique des fragments d'anticorps et les effets sur la taille (kDa) et le temps de demi-vie biologique ( $t_{1/2}$ ). Figure inspirée de Holliger et Hudson 2005

### 1.2.2. Les nanobodies

Les anticorps ne sont pas les seules protéines de l'immunité capables de se lier spécifiquement à un antigène. Il a été découvert en 1989 chez les camélidés et les Chondrichthyens (requins, raies, poissons cartilagineux) des anticorps dépourvus de chaînes légères. Ces structures de 110 AA, d'une taille de 12 à 15 kDa appelées heavy-chain antibodies (HCAbs) sont constituées de deux domaines constants (CH2 et CH3) et d'un domaine variable à chaîne lourde (VHH). Comme pour les IgG, les HCAbs s'organisent en 2 chaînes de polypeptides homologues liées par des ponts disulfures (Figure 28) et possèdent une grande diversité d'affinité semblable à celles des anticorps conventionnels.

Suite à ces découvertes, une nouvelle classe de protéines d'affinité composée uniquement de la VHH du HCAbs a été créée : les Nanobodies (Nb) ou single domain antibody (sdAb). Comme pour les anticorps humains, le VHH est composé d'une région hypervariable CDR (CDR1 à 3). Cette région confère la reconnaissance à l'antigène grâce à des boucles

regroupées sur une face de la molécule côté N-terminale (Nord et al. 1997). Les 3 boucles qui composent les 3 CDR relient les 4 feuillets  $\beta$  de la structure (Figure 15).



**Figure 15.** Structure d'un anticorps humain et de camélidé

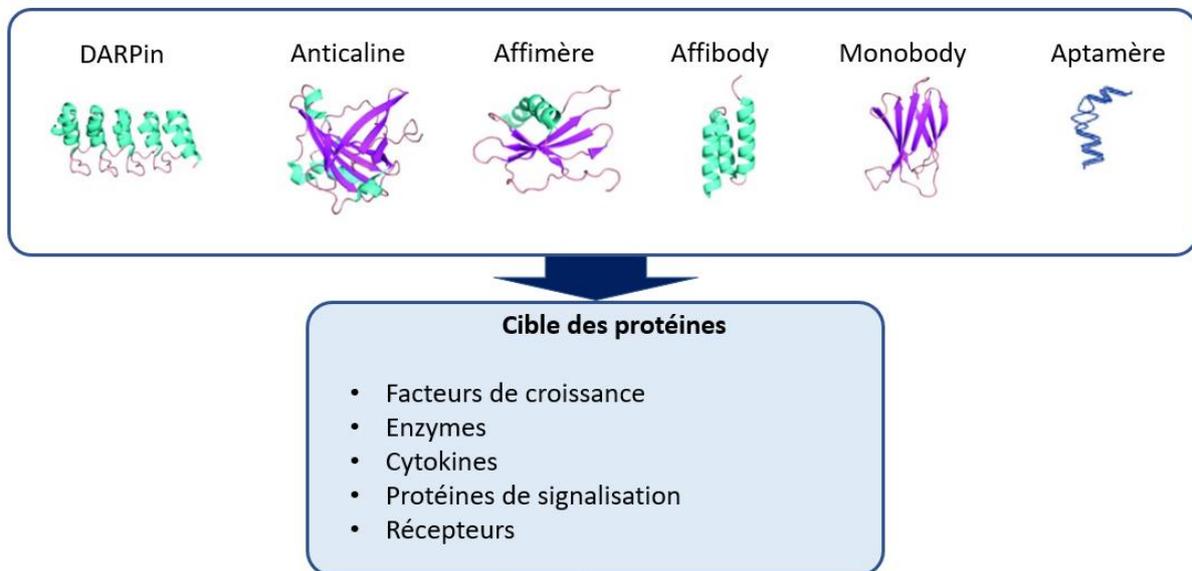
Les domaines variables (VHH) de chaque molécule d'anticorps sont représentés en jaune et le site de combinaison des antigènes (CDR) est indiqué par une case rouge.

De faible taille, les Nb ont une capacité à pénétrer dans les tissus supérieurs aux scFv et aux AcM rendant possible l'interaction avec des épitopes jusque-là hors d'atteinte (De Genst et al. 2006). La liaison du paratope avec des épitopes de forme concave est maintenant possible. De plus, les VHH ont une homologie avec les VH très forte, ce qui limite l'immunogénicité et en font des candidats intéressants comme vecteur. En raison de leur structure simple, des modifications par ingénierie ont été envisagées comme la création de multimères hétérospécifiques. Un Nb multimérique peut alors se lier à plusieurs antigènes différents. En plus d'une simplicité de structure, les Nb sont remarquablement stables à des conditions physico-chimiques extrêmes. C'est pourquoi, le couplage des Nb avec des radionucléides, peptides et autres molécules est envisageable pour des applications de diagnostic et de thérapeutique (Flicker, Zettl, et Tillib 2020). Enfin, la production des Nb est plus aisée puisqu'il est possible de les réaliser en système procaryotes (*E. coli* par exemple).

### 1.2.3. Les protéines d'échafaudages

Les possibilités thérapeutiques augmentent d'année en année avec une nouvelle catégorie de médicaments appartenant aux protéines d'échafaudages, qui ne sont pas des immunoglobulines, telles que les DARPins, les aptamères, les affimères, les FN3 monobodies, les affilines, les affitines ou nanofitines, les avimères, les nanoCLAMP et autres protéines à

fortes affinités contre des antigènes (Figure 16). La littérature dénombre une cinquantaine de protéines d'affinité non issues des immunoglobulines. Dans cette partie, nous ne serons pas exhaustifs et nous prendrons comme exemple les protéines d'échafaudages ayant permis des avancées dans le traitement du cancer colorectal (CCR).



**Figure 16.** Représentation des protéines d'échafaudages impliquées dans le ciblage thérapeutique

Le développement de ces nouvelles protéines d'échafaudages ou « scaffolds » combine des propriétés d'affinités, de simplicité structurale, de stabilité, de facilité de production, de petite taille et de résistance aux conditions physico-chimiques extrêmes. De manière générale, elles sont composées d'une seule chaîne peptidique sans résidu de cystéines. Leurs séquences sont hautement conservées et avec un enchaînement polypeptidique très similaire. Seules quelques AA sont hautement variables ce qui facilite l'insertion, la délétion ou la substitution d'AA sans altérer leur structure ou leurs fonctions. Il est important de noter que toutes ces protéines sont issues de bibliothèques synthétiques. Par conséquent leur génération se fait sans utiliser d'animaux.

**Les affibodies**\_ Une affibody dimérique dirigée contre la partie extracellulaire de l'EGFR produit une réduction faible, mais significative du taux de survie des cellules cancéreuses dans les CRC. Ces protéines dérivent du domaine B de la protéine A de *S. aureus*. Les affibodies, composés de 58 AA (6 kDa) organisés en 3 hélices  $\alpha$  rapprochées, ont une forte affinité naturelle pour le domaine Fc des IgG ainsi qu'une légère affinité pour le fragment Fab (Nord

et al. 1997). Des premières mutations réalisées sur cette protéine ont conduit à la formation d'un variant nommé domaine Z de plus forte affinité pour le fragment Fc, mais sans aucune affinité pour les fragments Fab (Löfblom et al. 2010). Des mutations volontairement introduites au niveau des hélices 1 et 2 du domaine Z ont permis d'améliorer la stabilité des affibodies lors de conditions de température et pH extrême.

*Les aptamères*\_ Ce sont des oligonucléotides d'ARN ou d'ADN de 20 à 80 bases et de 6 à 30 kDa. L'utilisation des aptamères a été montrée pour le diagnostic des maladies, la bio détection et l'administration de médicaments dans le traitement de cancer. Ils sont peu immunogènes, pénètrent mieux les tumeurs avec une diffusion homogène dans les sites tumoraux et ont une plus longue conservation. Les aptamères se comportent comme de très bons vecteurs lorsqu'ils sont couplés avec des siRNA, des médicaments antitumoraux ou des enzymes (Fu et Xiang 2020; Sivakumar et al. 2019). Les aptamères se fixent sur des récepteurs à la surface des cellules et libèrent les agents thérapeutiques qui vont être internalisés par la cellule par endocytose (Wan et al. 2019; H. J. Kim et al. 2020). La répression de la transcription de c-myc et de la cycline D1 dans les cellules cancéreuses de côlon par un ARN de haute affinité a conduit à un arrêt du cycle cellulaire. Une étude menée chez la souris a montré qu'avec l'utilisation d'un aptamère, il a été possible d'empêcher le développement de métastases de cellules cancéreuses humaines dans le foie de la souris (Y. J. Lee et al. 2012). Enfin, des aptamères ont montré leur efficacité comme vecteur ciblé pour l'administration de la doxorubicine aux cellules tumorales, car une faible toxicité pour les cellules non ciblées a été relevée (Macdonald et al. 2020).

*Les DARPins*\_ Les macromolécules « Designed Ankyrin Repeat proteins » sont caractérisées par une structure à répétition d'ankyrine (14 à 21 kDa). Constituées de 2 à 5 répétitions d'ankyrine entre un module N-terminal et C-terminal, les DARPins sont capables d'interagir avec des protéines impliquées dans l'initiation de la transcription, la régulation du cycle cellulaire, le transport d'ions ou encore la transduction de signaux. Un motif représente 33 AA structurés en 2 hélices  $\alpha$  antiparallèles précédé d'un coude  $\beta$  et suivi d'une boucle faisant le lien avec le motif suivant (Kawe et al. 2006). Des modifications au niveau de 7 AA et l'ajout d'une deuxième boucle peptidique favorisent une meilleure flexibilité et augmentent la surface d'interaction. Le rendement de production de ces protéines d'échafaudage est particulièrement intéressant puisqu'il peut atteindre 200 mg de protéine par litre de culture.

Du point de vue thérapeutique, des DARPins multimériques avec une affinité de l'ordre du nanomolaire ont été conçues comme anti-EGFR pour inhiber la prolifération cellulaire (D. Steiner, Forrer, et Plückthun 2008). Deux DARPins se liant à des épitopes différents et une leucine zipper sont capables de réduire le nombre de récepteurs de surface du facteur de croissance épidermique (EGFR) en inhibant le recyclage du récepteur, ce qui conduit à une réduction de la viabilité cellulaire (Soto-Gamez et al. 2020 ; Boersma et al. 2011). Cette DARPIn montre de meilleurs résultats que le cetuximab, un AcM chimérique.

*Les anticalines*\_ Les lipocalines constituent des protéines plasmatiques naturelles solubles et abondantes dans le corps humain. La technologie des anticalines permet de générer facilement des variants de lipocalines qui présentent une affinité élevée (picomolaire) contre un large éventail de structures cibles (des macromolécules aux haptènes de faibles poids moléculaires) (Vogt et Skerra 2004). Bien qu'elles aient une faible similarité dans leur séquence en AA, les lipocalines ont une homologie de leur structure tertiaire extrêmement conservée. D'une taille de 160 à 180 résidus, les lipocalines sont organisées en barillet  $\beta$  (constitué de 8 brins  $\beta$  antiparallèles disposés circulairement) et d'une hélice  $\alpha$ . Les brins du barillet  $\beta$  sont reliés par des boucles (1 à 4) qui forment la poche de liaison (Michaela Gebauer et Skerra 2012). La structure des boucles est la partie variable de cette protéine à l'instar du CDR des AcM. Les anticalines représentent donc des lipocalines adaptés *in vitro*. Les anticalines font l'objet de recherches pour une variété d'applications comme des traitements contre le cancer, l'asthme, l'anémie et les troubles métaboliques. De nombreuses anticalines font actuellement l'objet d'études cliniques en raison de leurs faibles effets secondaires attendus (Deuschle, Ilyukhina, et Skerra 2021).

*Les affimères*\_ Provenant de la protéine humaine stefin A ou de la protéine végétale phytocystatine, les affimères sont constitués de 4 feuillets  $\beta$  et une hélice  $\alpha$ . Les affimères sont une chaîne polypeptidique de 98 AA (Hoffmann et al. 2010). Les boucles reliant les feuillets  $\beta$  sont le lieu d'interaction privilégié avec la cible. Un ensemble d'affimère a pu être développé contre des cibles variées grâce à la haute variabilité des boucles. En ciblant le VEGFR2, une protéine clé dans la formation de vaisseaux sanguins des tumeurs, l'affimère est un nouveau moyen de ciblage (Nord et al. 1997). De plus, il montre une efficacité de coloration similaire à celui d'un anticorps anti-VEGFR2 déjà commercialisé. La sensibilité accrue dans les marquages histochimiques s'explique par une meilleure capacité à pénétrer dans les tissus

suite à la plus petite taille de l'affimère. De plus, la capacité des affimères à être modifiées sur un site spécifique permet d'ajouter un fluorophore par l'ajout d'une cystéine. L'utilité des affimères a donc été montrée pour la détection de biomarqueurs tumoraux dans les tissus et la bio-imagerie (Tiede et al. 2017).

*Les monobodies*\_ Leur structure est basée sur le domaine de type III de la fibronectine, c'est-à-dire une structure en feuillets  $\beta$  composée de 7 boucles à l'enchaînement en AA très variable permettant la reconnaissance et la fixation à diverses cibles (A. Koide et al. 1998). Deux bibliothèques de monobodies ont été créées, la première avait des modifications sur les boucles soit au niveau du site d'interaction, la deuxième diversifie les AA au niveau d'un segment du feuillet  $\beta$ . Cette nouvelle bibliothèque a permis de créer des monobodies avec une surface de liaison concave, augmentant l'éventail des cibles disponibles à la sélection (protéine-protéine) (Akiko Koide et al. 2012).

D'autres protéines d'échafaudages sont mentionnées pour lutter contre le CCR. En 2009, l'Ecallantide, une protéine d'échafaudage basée sur le domaine de Kunitz (domaine actif d'une protéine qui inhibe les protéases), a été développée cliniquement puis approuvée par la FDA. Un médicament contre VEGFR2 cette fois est en essai clinique de phase II, il utilise l'Adnexin comme protéine d'échafaudage. La fonctionnalisation d'un nanobody avec un aptamère qui cible EpCAM, un biomarqueur du cancer colorectal, a permis de délivrer de manière spécifique le curcumin aux cellules cancéreuses de côlon. Dans leurs essais, la bioconjugaison de différentes protéines d'échafaudage augmente les interactions avec les cellules cancéreuses. La bioconjugaison pourrait être une des clés permettant de surmonter la résistance aux médicaments.

Si l'utilité des protéines alternatives aux anticorps est évidente pour la détection de nouveaux biomarqueurs thérapeutiques (Tans et al. 2020), les protéines d'échafaudages ont des atouts dans d'autres domaines. Leur forte affinité leur permet de remplacer les anticorps dans les marquages des coupes histochimiques et les marquages de fluorescence pour la microscopie (Bedford et al. 2017). Lorsqu'elles sont fixées sur un support, leur capacité sélective encourage leur utilisation dans les processus de purification sur colonne. Dans ce domaine, une nouvelle famille de protéines alternatives aux anticorps s'illustre : les affitines et les nanofitines.

#### 1.2.4. Les affitines comme outils diagnostique et thérapeutique

Issues des protéines de la famille Sac7d, Sul7d et SSo7d, les affitines et nanofitines sont deux classes de protéines qui dérivent des archées *Sulfolobus acidocaldarius* vivant dans les sources hydrothermales du Parc de Yellowstone. Constituées d'une chaîne polypeptidique de 66 AA sans pont disulfure, elles comportent une hélice  $\alpha$  et 5 segments de feuillet  $\beta$  (Kruziki et al. 2015) (Figure 17). La cristallographie de ces protéines montre une architecture de type SH3-similaire. Les archées sont capables de résister aux conditions particulièrement extrêmes des sources hydrothermales grâce au repliement compact en forme de tonneau des protéines.

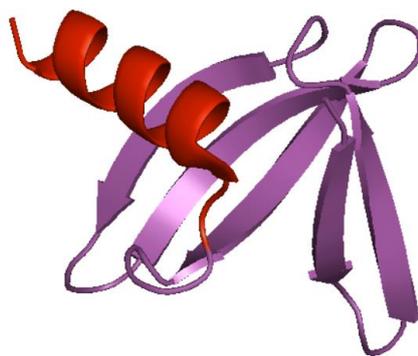


Figure 17. Structure de l'affitine H4 avec l'hélice alpha en rouge et les 5 segments de feuillet béta en magenta (Pymol)

Chez les archées, ces protéines jouent le rôle de stabilisateur de la chromatine protégeant de ce fait de la dénaturation de l'ADN sous l'effet de la chaleur. La stabilité chimique et thermique a été démontrée pour Sac7d (pH 0 à 12 et  $T_m=90,4$  °C) et pour Sso7d (pH 0 à 13 et  $T_m= 100,2$  °C). La sélectivité de l'affitine pour l'ADN double brin peut être modifiée lors de mutations localisées sur les segments  $\beta$ . La création de séquences homologues avec 10 à 14 AA mutés aléatoirement et l'extension de la boucle terminale constitue la bibliothèque de variants.

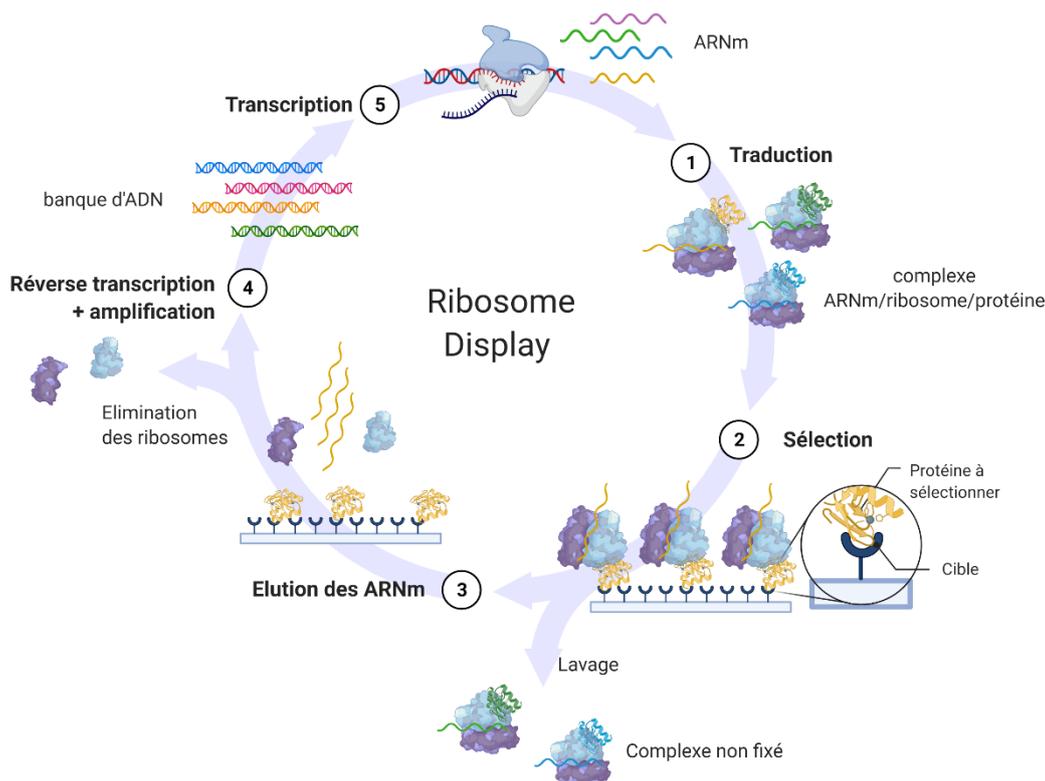
Pour réaliser cette bibliothèque, deux méthodes d'ingénierie protéique sont possibles. La conception rationnelle nécessite des connaissances approfondies de la structure et de l'enchaînement en AA. La modification spécifique de quelques résidus par mutagenèse dirigée permet de donner une fonction précise à la protéine. La mutagenèse dirigée peut utiliser des oligonucléotides ou des nucléases. Les protéines sont des macromolécules aux interactions complexes pour lesquelles nous n'avons pas toujours les connaissances

suffisantes pour comprendre le lien entre la séquence primaire et la structure 3D finale. Dans ce cas, l'emploi de l'évolution dirigée est plus indiqué. Ce concept a pour but de mimer l'évolution naturelle de façon accélérée. Un gène codant pour une protéine subit plusieurs cycles de mutations aléatoires afin de générer une grande quantité de variants.

Le lysozyme et l'immunoglobuline G ont été choisis comme premières cibles pour évaluer le potentiel de liaison des affinités de la bibliothèque. Les protéines ont ensuite été sélectionnées sur leur capacité à se lier à une cible précise par des méthodes de sélection *in vitro* telles que le ribosome display, phage display, mRNA display, CIS display.

Le principe du ribosome display est de supprimer le codon-stop ce qui conduit le ribosome à s'arrêter à l'extrémité de l'ARNm après la traduction de la protéine, empêchant le complexe traductionnel d'être libéré. Les protéines traduites vont se replier hors du ribosome. L'ARNm, le ribosome et la protéine traduite vont former un complexe non covalent qui sera alors possible de cribler sur des cibles immobilisées (colonne de chromatographie d'affinité, plaque 96 puits ou billes magnétiques). En raison d'une fragile stabilité de ce complexe, il est facile de séparer les éléments du complexe pour ne garder que l'ARNm (Figure 18). Les séquences individuelles sont récupérées par transcription inverse. La banque d'ADN initial est donc remplacée au fur et à mesure des tours de cycle par des séquences de plus en plus affines pour la cible recherchée (Park, Lui, et Cochran 2017).

Par ce principe de ribosome display, il a été généré de nombreuses affinités avec des affinités de l'ordre du picomolaire (Kalichuk et al. 2020). Des affinités provenant de la famille Sso7d ont permis d'obtenir des protéines de plus grande stabilité que les protéines homologues de la famille Sac7d (Béhar et al. 2014). Des travaux récents font l'état d'une protéine Ah07c de la famille Sul7d, qui conserve une stabilité thermique ( $T_m=96.8$  °C) et chimique (pH 0 à 13) importante malgré la perte de 6 AA (Kalichuk et al. 2016 ; M. Gebauer et Skerra 2019). La sélection et la caractérisation d'affinité appartenant à la famille Sul7d a permis de produire des affinités dirigées contre une grande diversité de cibles protéiques présente à la surface de cellules animales (lysozyme de poulet), de cellules humaines (IgG, CD138, EpCAM,  $\beta$ -caténine), de plantes ou de bactéries (streptavidin, pulD) (Pacheco et al. 2014 ; Kalichuk et al. 2018a ; Buddelmeijer et al. 2009 ; Béhar et al. 2019).



**Figure 18.** Méthode de sélection *in vitro* par Ribosome Display

En raison de leur petite taille et de leur grande stabilité, les affinités/nanofitines sont faciles d'ingénierie et offre de nombreuses applications :

Les nanofitines peuvent facilement jouer le rôle de vecteur en imagerie. En effet, avec l'ajout d'une cystéine à l'extrémité C-terminale, il devient possible de greffer un fluorophore ou un radionucléide grâce au groupement thiol (SH) disponible. Des applications ont été trouvées avec une nanofitine anti-lysozyme- $^{18}\text{F}$  pour l'imagerie TEP (Dammicco et al. 2017). D'ailleurs grâce à leur poids moléculaire inférieur à 20 Da, la pénétration tissulaire est meilleure que celle des AcM. Le marquage avec la GFP a été réalisé sur des Nanofitines anti-TNF $\alpha$  et anti-PulD pour améliorer l'imagerie optique (Huet et al. 2015).

Les affinités peuvent servir d'outils de détection *in vitro* ou de méthode de purification (Béhar et al. 2016). Une résine contenant des affinités anti-IgG a été immobilisée sur une colonne de chromatographie. A l'aide des interactions spécifiques de l'affinité avec la partie Fc des IgG, il est alors possible de retenir les IgG et d'éliminer les autres constituants d'un mélange. La fixation réversible des IgG leur permet d'être éluées facilement. Par ajout d'une étiquette d'hexa-histidine aux affinités, celles-ci peuvent être fixées sur une couche de

phosphonate de zirconium. Cette technologie permet la création de puces sur lesquelles une forte densité de protéines fonctionnelles est immobilisée (Cinier et al. 2009). Comme les affitines ont la capacité d'être bifonctionnelles, le site de reconnaissance reste libre pour la fixation de ligand. La capacité de fixation à d'autres protéines en même temps que l'immobilisation a donné des applications pour le Western-blot et les ELISA (Béhar et al. 2019). La fusion de la GFP (green fluorescent protein) ou de la phosphatase alcaline avec des affitines n'entraîne pas de modification de la structure et donc n'impacte pas la spécificité de liaison, c'est pourquoi elles ont été employées également à des fins d'immuno-localisation dans des tissus (Miranda et al. 2011 ; Krehenbrink et al. 2008).

Les affitines sont avant tout développées dans le but de servir de traitement thérapeutique. Certaines de ces protéines pourraient servir comme inhibiteur enzymatique anti-glycosidases (CelD ou lysosyme de poulet) (Correa et al. 2014a) ; permettraient de lutter contre les résistances aux antibiotiques avec les anti- *Escherichia coli*, *Streptococcus gallolyticus*, *Staphylococcus aureus* ou encore *Klebsiella oxytoca* (Béhar et al. 2019); aideraient à diminuer les actions non ciblées en oncologie en provoquant une réponse biologique et permettant une plus grande accumulation de nanoparticules lipidiques transportées au niveau du tissu cancéreux. Les caractéristiques physico-chimiques surprenantes des affitines permettent d'envisager leur utilisation dans des maladies inflammatoires du tractus digestif (anti-TNF $\alpha$ ), mais également dans les maladies liées au vieillissement comme la dégénérescence maculaire lié à l'âge (anti-VEGF) (Projet NanoFar 2014-06-C3)(Huet et al. 2015). La génération d'affitines a généré de nombreux brevets qui sont exploités par l'entreprise Affilogic créée en 2010. Certaines sont en cours d'essai clinique.

Capables de se fixer sur des anticorps, des antigènes exprimés à la surface de cellules tumorales et des protéines circulantes, les affitines représentent une nouvelle classe de protéine d'intérêt majeur. Outre le rôle grandissant des affitines dans l'arsenal thérapeutique et diagnostique, l'ingénierie protéique confère des qualités supplémentaires que ne possèdent pas les AcM. La production en système bactérien (*E. coli*) en majorité permet d'obtenir des rendements de production supérieurs aux AcM (de 10 à 200 mg par litre de culture) avec un coût bien inférieur.

## **2. Les polluants : ces xénobiotiques cachés que nous consommons**

A l'inverse des médicaments, les polluants sont des xénobiotiques qui peuvent présenter des effets non souhaités sur l'organisme humain. Les polluants représentent une très grande famille de composés naturels ou artificiels introduits par l'Homme dans l'environnement et qui modifient les écosystèmes. Il faut distinguer les polluants biologiques (champignons, bactéries, algues, parasites), les polluants physiques (irradiation, lumière, bruit, chaleur), des polluants chimiques (pesticides, perturbateurs endocriniens, plastiques, détergents, cosmétiques et résidus de médicaments). Dans cette partie, nous allons comprendre l'intérêt de s'interroger sur les effets des polluants pour la santé humaine.

### **2.1. Une diversité de polluant à l'origine d'une toxicité environnementale**

#### *2.1.1. Les sources de pollutions*

L'origine des pollutions est diverse, elle peut être naturelle avec le dégagement de gaz engendré par l'activité volcanique et les feux de forêts ou bien être liée à l'activité de l'Homme. Les sources fixes qui concernent les raffineries de pétrole, les installations industrielles et les usines s'opposent aux sources mobiles qui concernent l'ensemble des moyens de transport. En 2012, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a classé les particules émises par les moteurs diesel comme cancérogènes. Une autre source, et pas la moindre, provient des villes et des activités agricoles, cette part compte pour 94 % de la pollution atmosphérique (Chiffre de CITEPA 2019).

Les polluants sont distingués en fonction de leur persistance dans l'environnement. Les pollutions primaires émises directement par la source (l'oxyde nitrique, le dioxyde de soufre, les hydrocarbures) persistent sans modification et sont peu toxiques. Par contre, les pollutions secondaires issues de l'interaction des polluants primaires avec les composés atmosphériques (trioxyde de soufre, dioxyde d'azote, aldéhydes, cétones, ozone) sont plus toxiques. Certains polluants sont biodégradables, ils sont décomposés rapidement par des processus naturels (champignons, réactions chimiques) ou des systèmes de traitement, comme c'est le cas avec les eaux usées traitées en station d'épuration (Figure 19).

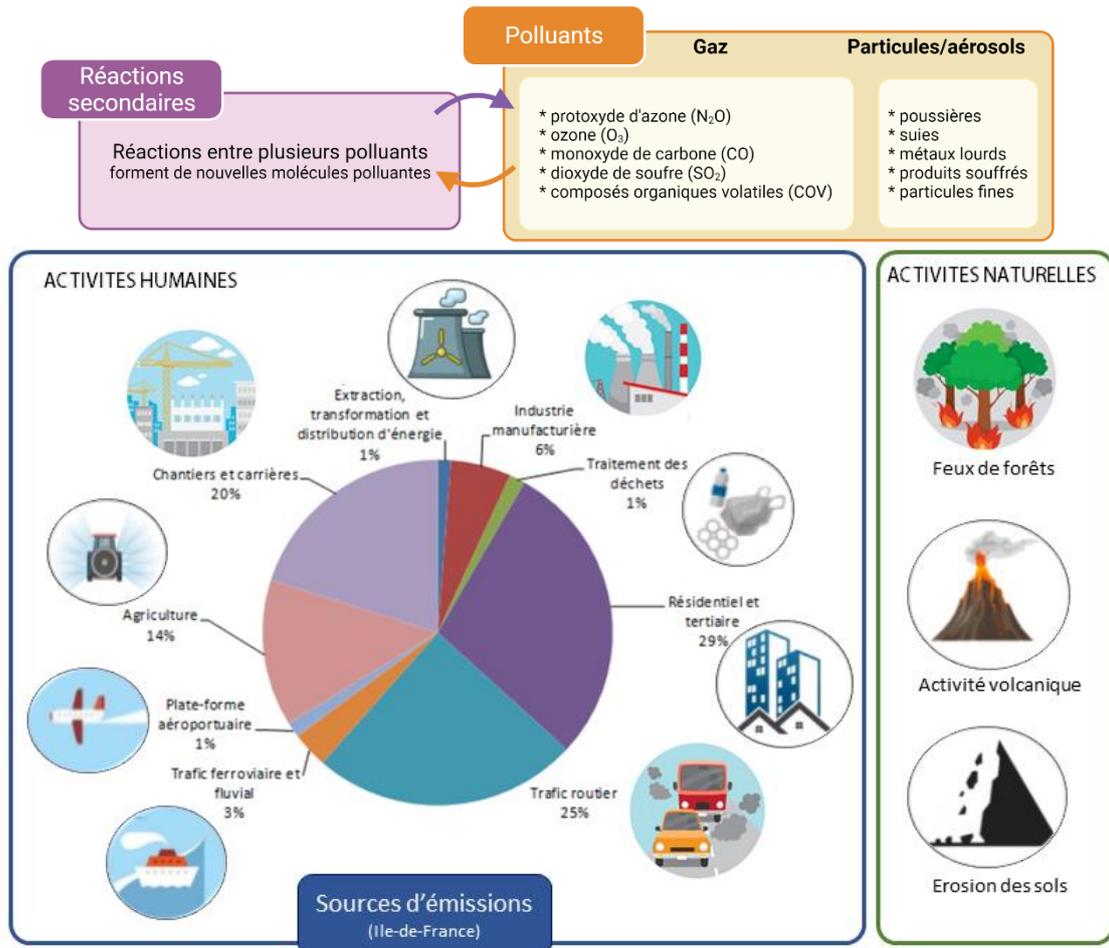


Figure 19. Les sources de pollution émises dans l'environnement

Les polluants non dégradables sont la plus grande source de préoccupation puisqu'ils s'accumulent et entrent dans les chaînes alimentaires de l'écosystème. Le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) est un insecticide et acaricide utilisé dans les maisons pour lutter contre les allergies ou par les militaires pour lutter contre le paludisme. Lorsqu'il se retrouve dans les cours d'eau, il va être absorbé par le phytoplancton qui est lui-même mangé par les poissons. Le danger est la bioaccumulation chez le poisson qui devient nocive pour l'espèce, entraînant des stérilités et la diminution des populations.

### 2.1.2. Classification des polluants

**Les hydrocarbures\_** Depuis la révolution industrielle, les hydrocarbures constituent la principale ressource énergétique, leur combustion est une source majeure de la pollution atmosphérique. Ils participent à l'émission de gaz à effet de serre responsable du réchauffement climatique. Les accidents de type marée noire polluent les océans, les

dispersants chimiques employés pour éliminer les nappes de pétrole présentent une menace pour la vie aquatique (réduction de la photosynthèse des micro-organismes marins). Or l'absorption grandissante de CO<sub>2</sub> acidifie les océans et détruit les récifs coralliens, ce qui nuit au développement des coquillages, crustacés et micro-organismes à la base de la chaîne alimentaire (Landrigan et al., 2020).

**Les matières azotées et phosphorées**\_ Les épandages agricoles riches en matières azotées et phosphorées et les rejets industriels dans les cours d'eau sont à l'origine de l'eutrophisation des lacs. Les algues recevant en trop grandes quantités les matières nutritives prolifèrent à l'excès et recouvrent les surfaces des lacs. L'oxygène absorbé en grande quantité lors de la décomposition provoque une asphyxie de l'écosystème aquatique (Paul, Bhattacharya, et Gogoi 2021).

**Les pesticides**\_ Principalement utilisés pour l'agriculture et l'entretien des voiries, ils sont répandus volontairement pour lutter contre les organismes nuisibles qui affectent les cultures et plantations. Les biocides ont pour but d'éliminer les animaux (insecticides, rodenticides) tandis que les produits phytosanitaires s'attaquent aux plantes (herbicides), champignons (fongicides) et bactéries (bactéricides). Les composés de synthèse carbamates, pyréthroïdes, organophosphorés sont très toxiques chez les vertébrés.

Le glyphosate, un herbicide largement utilisé en agriculture, affecte la composition de la microflore du sol en supprimant certains micro-organismes et en favorisant d'autres dans la rhizosphère (Kremer et Means 2009). Ces modifications des populations bactériennes ont été également observées dans le tractus digestif (Shehata et al. 2013). La toxicité des pesticides est liée en partie à leur formulation. En effet, la composition du Roundup comporte le glyphosate comme principe actif et des surfactants tels que la polyoxyéthylène amine qui font office de tensioactif. Or la synergie des deux composés est plus toxique que le principe actif seul. De faibles concentrations d'herbicides à base de glyphosate peuvent provoquer des effets tératogènes et des troubles du développement chez les amphibiens dès le stade larvaire (N. Wagner et al. 2013).

Les informations sur la toxicité des formulations de pesticides s'enrichissent de nouvelles études pour le système nerveux, le système cardiovasculaire, les mitochondries, le matériel génétique et les systèmes hormonaux (Oakes et Pollack 1999). Une formulation

contenant du glufosinate semble provoquer une baisse de la pression sanguine et des changements dans la fréquence cardiaque des rats, dans les études *in vivo* (Koyama, Koyama, et Goto 1997). L'effet de la formulation pour un herbicide contenant de l'atrazine a montré une augmentation des dommages à l'ADN dans les lymphocytes humains alors que le principe actif de l'atrazine seul n'avait pas d'effet (Zeljezic, Garaj-Vrhovac, et Perkovic 2006).

**Les détergents et désinfectants**\_ Tous les agents de type surfactants sont des composés chimiques (alkylsulfates, ammoniums quaternaires) qui entrent dans la composition des produits d'entretien, du textile, de la métallurgie et des cosmétiques. L'ADEME (Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie) a publié en 2017 une étude sur l'eau de Javel qui augmente significativement le risque d'infection respiratoire chez l'enfant. Il a été décrit que les détergents jouaient un rôle non négligeable dans l'augmentation dans les sols de la solubilité d'autres polluants, qui par conséquent sont plus facilement absorbables par les organismes vivants (Venhuis et Mehrvar 2004).

**Les plastiques et plastifiants**\_ Les plastifiants sont des molécules sous forme liquide ou solide ajoutés à différents matériaux pour les rendre plus flexibles et plus résistants. Le Bisphénol A et les phtalates représentent respectivement 3,8 et 6 millions de tonnes de production annuelle mondiale (Geens et al. 2009) (Peijnenburg et Struijs 2006). Il est connu depuis longtemps leur impact dans l'environnement en raison de leur caractère non biodégradable. Le rejet sauvage est suspecté d'être à l'origine de troubles de la reproduction sur l'Homme et la faune (Deshayes et al. 2015).

**Les médicaments**\_ Les résidus de médicaments sont éliminés dans les selles et les urines, or leur très petite taille leur permet de passer au travers des filtres des stations d'épuration se retrouvant de ce fait dans les sols et les rivières. Ces molécules étant prescrites en raison de leurs effets sur la santé humaine, il est envisageable de penser qu'elles peuvent induire des effets chez d'autres espèces. De plus, si ces résidus se retrouvent dans les eaux de consommation humaine, nous pouvons supposer que nous absorbons des antibiotiques, hormones de synthèse, médicaments anticancéreux, anti-inflammatoires en quantité infime. Les risques à court terme semblent négligeables en raison des très faibles concentrations détectées dans les eaux en France. En revanche, les risques liés à une exposition chronique ne peuvent pas être exclus.

L'utilisation d'inhibiteurs de la tyrosinase dans les produits cosmétiques présente un impact écotoxicologique sur les organismes aquatiques qui se traduit par une diminution de la population des poissons à nageoires (téléostes) (Cho et al. 2020). Plusieurs molécules œstrogènes sont connues pour interférer avec la régulation des stéroïdes sexuels chez les poissons. Ces perturbateurs endocriniens sont responsables de la féminisation des populations. Par exemple, les téléostes mâles exposés à la molécule estrone dans les eaux contaminées vont convertir l'estrone en estradiol, ce qui va favoriser leur féminisation (Milla, Depiereux, et Kestemont 2011).

Les études qui s'intéressent au diclofénac, un anti-inflammatoire non stéroïdien très prescrit, montrent qu'une trop grande exposition peut multiplier par quatre le risque d'accident vasculaire cérébral chez l'homme (Schmidt, Sørensen, et Pedersen 2018). Or l'équipe de Francesco Bergoli explique que « plus de 10 000 km de rivières, dans le monde entier, contiennent des concentrations supérieures à 100 ng/L, soit au-delà du seuil d'alerte de l'Union Européenne » (Acuña et al. 2020).

Les expositions fortuites aux médicaments concernent aussi les antibiotiques. Dans les pays en développement en zone urbaine, les eaux usées des ménages et des hôpitaux sont combinées dans des stations d'épuration, ce qui rassemble les fèces humaines et le fumier animal. Par conséquent, les micro-organismes présentant des résistances aux antibiotiques sont rassemblés en un cocktail sous pression, ce qui stimule le transfert des gènes de résistance à d'autres micro-organismes (Boelee et al. 2019).

**Les micropolluants\_** La notion de détection des polluants dans l'environnement a mis en évidence la présence des micropolluants qui sont rejetés en très faibles quantités ( $\mu\text{g/L}$  ou  $\text{ng/L}$ ), mais qui présentent pourtant une forte toxicité liée à leur capacité de bioaccumulation. L'accumulation des microplastiques, des métaux lourds dans les tissus engendre des effets négatifs sur les organismes vivants, et leur persistance dans les sols et les eaux amplifie ce phénomène. La problématique des métaux lourds par exemple est très forte, car ils sont responsables d'une partie de la pollution de l'air (S. Hou et al. 2019 ; S. Yang et al. 2020), mais sont également biopersistants. Ils détériorent les sols (appauvrissement des champs de culture), dégradent la qualité des eaux de surfaces utilisées pour la consommation humaine, s'accumulent dans la chaîne alimentaire et perturbent les écosystèmes. Certains métaux comme le zinc, le cuivre, le magnésium et le fer sont des oligo-éléments nécessaires aux

organismes vivants en faible quantité. Ils participent aux réactions biochimiques du métabolisme humain et des plantes, leur absence entraîne donc des carences. Ces oligo-éléments sont présents naturellement dans l'eau et les aliments. D'autres oligo-éléments ne jouent aucun rôle utile et sont par conséquent toxiques à n'importe quelle dose, c'est le cas du plomb, du cadmium, du nickel, de l'aluminium et de l'arsenic.

Cette atteinte écologique peut avoir des conséquences indirectes pour la santé humaine. Les métaux lourds comme le méthyl-mercure sont les polluants océaniques dont les effets sur la santé humaine sont le mieux compris. L'accumulation des métaux lourds dans les poissons consommés par les adultes augmente les risques de maladie cardiovasculaire et de démence (Virtanen et al. 2005). Les risques sont accrus pour le cerveau en développement des nourrissons *in utero*. Certains sont même cancérigènes pour l'Homme (Amqam et al. 2020).

## **2.2. Les Herbicides**

### *2.2.1. Réglementation*

Bien qu'un ensemble de mesures soit pris pour lutter contre la présence de polluant dans l'eau de consommation humaine, les moyens déployés ne suffisent pas pour les éliminer totalement. Des mesures ont donc été mises en place pour assurer une qualité de l'eau constante conformément à l'arrêté du 10 juillet 1996.

La qualité de l'eau consiste à mesurer et quantifier un ensemble de composés afin de s'assurer de la conformité bactériologique et organoleptique dans le but de valider l'innocuité de l'eau qui sera distribuée. La dureté de l'eau est une question d'équilibre, la présence en minéraux tels que le calcium ou le magnésium à forte concentration a l'inconvénient d'entartre les conduits d'acheminement de l'eau, alors qu'une eau trop douce favoriserait la dissolution des métaux des canalisations et pourrait à ce titre entraîner des risques pour la santé. Les taux d'aluminium (< 0,2 mg/L) et de nitrate (< 50 mg/L) sont également contrôlés.

La présence des résidus de pesticides et de leurs métabolites dans les eaux est encadrée par plusieurs réglementations européennes et nationales. Le règlement UE n° 528/2012 fixe les conditions de mise sur le marché des biocides et le règlement CE n° 1107/2009 celui des produits phytopharmaceutiques. Les directives 2000/60/CE (DCE) et 2006/118/CE sont relatives à la protection des ressources en eau.

La directive 98/83/CE concerne la qualité des Eaux destinée à la consommation humaine (EDCH). C'est elle qui définit le terme de pesticides comme « les insecticides organiques, les herbicides organiques, les fongicides organiques, les nématicides organiques, les acaricides organiques, les algicides organiques, les rodenticides organiques, les produits anti-moisissures organiques, les produits apparentés (notamment les régulateurs de croissance) et leurs métabolites, produits de dégradation et de réaction pertinents ». La réglementation indique qu'il est nécessaire de contrôler la présence de pesticides, mais ne propose pas de critère de pertinence (qui contrôler, quand, où et combien de fois).

La directive 2006/118/CE complète la notion de pertinence des métabolites de pesticides qui n'était jusque-là pas mentionnée. Ainsi, la caractérisation de l'état chimique des eaux souterraines prend en compte les « substances actives des pesticides, ainsi que les métabolites et produits de dégradation et de réaction pertinents » auxquels sont associées les normes de qualité de 0,1 µg/L par substance individuelle et de 0,5 µg/L pour la somme de tous les pesticides détectés.

Selon l'ANSES, la limite de qualité de 0,1 µg/L fixée dans les EDCH ne repose pas sur une approche toxicologique et n'a donc pas de fondement sanitaire, mais a été fixée dans un objectif de protection de la ressource. L'OMS a commencé à évaluer la toxicité des pesticides dans les années 1980 et a donné dès 1984 des concentrations maximales admissibles basées sur une évaluation du risque par ingestion d'eau. Les eaux dépassant la valeur limite doivent être utilisées uniquement sur une courte période, le temps pendant lequel les actions de remédiation sont mises en œuvre (ANSES, 2019). La surveillance et le contrôle des rejets de ces polluants dans notre environnement sont donc un enjeu de santé publique réglementé.

### *2.2.2. Les voies de transfert*

Les produits phytopharmaceutiques sous l'appellation herbicide ont été développés contre les plantes appelées « mauvaises herbes » qui poussent au milieu des champs agricoles. Le caractère sélectif de l'herbicide provient de sa structure chimique. C'est d'ailleurs par le mode d'action sur la plante que les herbicides sont regroupés en famille (Annexe II).

Ces plantes qui ne sont pourtant pas nuisibles puisent les ressources du sol et diminuent les rendements de production agricole. Leur utilisation est soumise à une régulation par le Code Rural et de la Pêche Maritime puisqu'ils font partie des pesticides. Une fois appliquées,

ces substances vont agir contre leur cible d'action. Elles peuvent, cependant, affecter de façon non intentionnelle d'autres organismes, ne présentant pas de danger, au niveau du site d'application ou à distance de ce site par transport et dispersion de résidus dans l'environnement.

Une des pistes d'action pour limiter cette diffusion est de connaître les mécanismes de transfert puisqu'ils sont majoritairement liés au circuit de l'eau. L'infiltration est un processus lent. Les résidus de pesticides solubles à la surface des sols migrent de façon verticale, entraînés par l'eau, pour rejoindre les nappes d'eau souterraines. Lors d'évènement particulier en cas de pluie diluvienne par exemple, le débit est augmenté, accentuant l'infiltration, on parle alors de lessivage. Les résidus de pesticides en solution ou absorbés par des particules peuvent aussi être entraînés par ruissellement à la surface du sol pour rejoindre les lacs et rivières de surface. Tous les pesticides épanchés ne sont pas piégés dans les organismes ciblés. Une grande partie d'entre eux est dispersée dans l'atmosphère, soit lors de leur application soit par évaporation. Les gouttelettes en suspension sont emportées par le vent et parfois loin de leur lieu d'épandage. Les pesticides sont ainsi aujourd'hui à l'origine d'une pollution diffuse qui contamine toutes les eaux : cours d'eau, eaux souterraines et zones littorales (Figure 20).

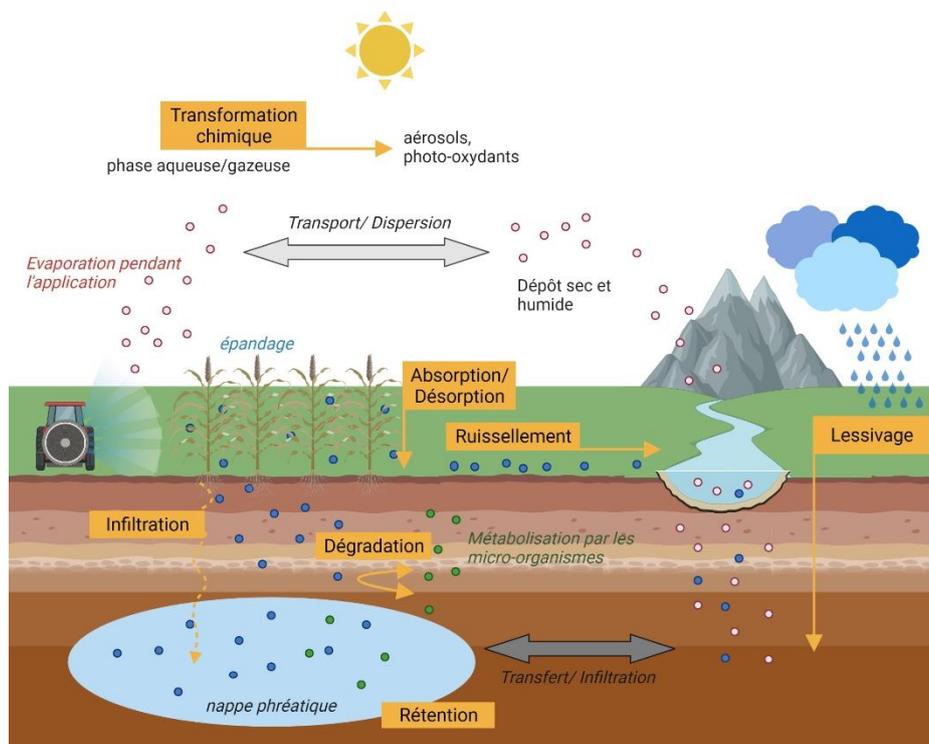


Figure 20. Processus de diffusion des polluants dans l'environnement.

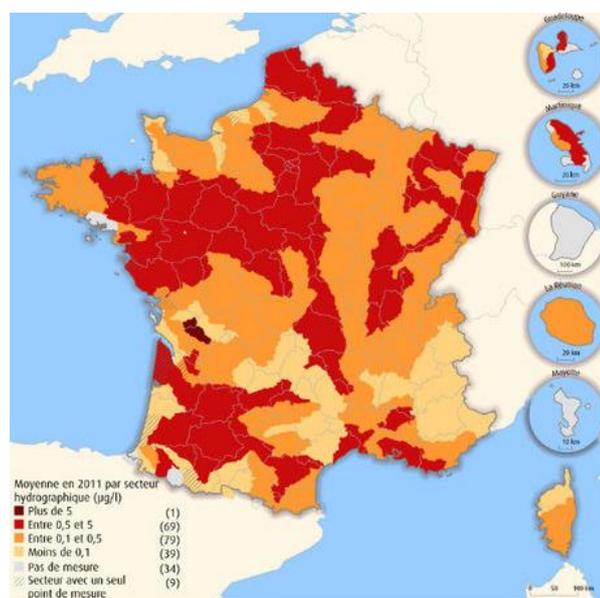
La complexité des études sur les pesticides provient de la grande diversité des produits régulièrement mis sur le marché. Il devient difficile de connaître les mécanismes de rétention ou de dégradation pour l'ensemble des molécules présentes sur le marché. Les paramètres d'absorption dans les sols, de durée de vie, de toxicité des sous-produits de dégradation ne sont pas imposés dans les réglementations. C'est une source de pollution ardue à maîtriser puisqu'elle est diffuse, par opposition à la pollution accidentelle qui est ponctuelle.

## 2.3. La surveillance et contrôle de la pollution

### 2.3.1. Les indicateurs de qualité

Le suivi de la pollution de l'eau et des sols en France est assuré par des organismes effectuant des prélèvements réguliers comme la Banque Nationale des prélèvements quantitatifs en eau (BNPE), le Service de l'observation et des statistiques (SOeS), le Bureau de recherches géologiques et minières (BRGM) ou l'Agence régionale de santé (ARS).

D'après une étude rendue publique par le Commissariat général au développement durable « La contamination des cours d'eau en pesticides est quasi généralisée en France. Seuls 7 % des points en sont exempts. » La qualité des eaux souterraines est régulièrement questionnée d'autant qu'elle est utilisée pour les EDCH (Figure 21).



**Figure 21.** Répartition géographique de la pollution des cours d'eau. *Carte de SOeS 2013*

D'après la BDRHFV1 du BRGM, agences de l'eau, offices de l'eau BRGM, banque de données ADES, réseaux RCS et RCO Traitement

Pour connaître le degré de pollution d'une eau et déterminer si elle est propre à la consommation, un ensemble de paramètres sont regardés : les matières en suspension totale après filtration, la demande chimique ou biochimique en oxygène, et le pH. Il existe également des bioindicateurs de la qualité chimique et écologique. L'utilisation d'organismes vivants pour dégrader des composés est un moyen de bioremédiation alternatif quand les méthodes classiques ne suffisent pas. De plus, avec une collecte standardisée des organismes vivants, il est possible d'obtenir des informations sur la santé de l'écosystème et de connaître le type de pollution qui l'affecte.

### 2.3.2. Analyse et traitement des eaux

**La détection des polluants**\_ Les méthodes de détection utilisées pour les principes actifs de pesticides et leurs métabolites sont basées sur la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (Fenoll et al. 2012). Des variations sur cette base offrent des capacités de détection plus ou moins résolutes et sensibles. Par exemple les limites de quantification technique en LC-MS/MS sont comprises entre 0,005 et 0,02 µg/L.

La qualité d'une analyse de l'eau implique de garantir la maîtrise de l'ensemble de la chaîne de mesure depuis le prélèvement jusqu'à l'expression des résultats. De nombreux biais sont liés à la stabilité des composés testés. En effet, les produits de transformation peuvent avoir des temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) plus longs que la substance active. Par exemple l'atrazine possède un  $t_{1/2}$  de 64 jours, le métolachlore un  $t_{1/2}$  de 42 jours et le diuron de 328 jours (Frank et Sirons 1985) (Jury et al. 1987). Les analyses après prélèvement effectué au-delà de cette demi-vie prennent le risque d'une disparition de la molécule mère dans l'échantillon.

Les outils analytiques disponibles ne permettent pas toujours de détecter les polluants, surtout quand ces derniers sont présents à l'état de trace et passent en dessous des seuils de détection techniques. L'analyse des métabolites en est par ailleurs fortement impactée puisque nous ne disposons pas à chaque fois des étalons analytiques pour chaque métabolite.

**Traitement en station d'épuration**\_ En France environ 66 % de l'EDCH est produite à partir d'eau souterraine et 34 % à partir d'eau de surface (données de 2012). L'ensemble des stations d'épuration ne réalisent pas les mêmes traitements, car la répartition géographique des polluants diffère selon les activités régionales. 83 % des installations font appel à des traitements simples (désinfection et filtration à grande échelle), 12 % ont recours à des

méthodes plus poussées (coagulation, floculation, décantation, oxydation chimique, procédé membranaire...) en vue d'éliminer la turbidité, les algues et les contaminants d'origine naturelle. Les 5 % restant n'ont pas besoin de recourir à des désinfectants.

L'eau captée dans les stations de pompage va être acheminée jusqu'à l'usine de traitement de l'eau où elle va subir plusieurs étapes de traitement/désinfection pour être conforme aux réglementations en vigueur avant d'être distribuée dans le réseau d'eau potable des villes (Figure 22).

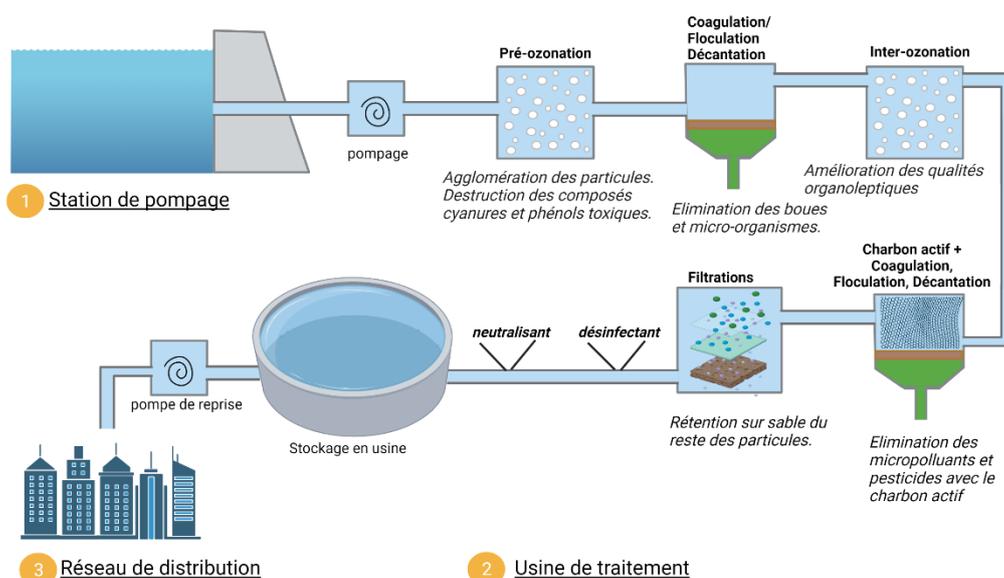


Figure 22. Circuit de l'eau depuis la station de captage jusqu'aux réseaux de distribution domestiques

L'accès à une eau potable n'est pas égalitaire sur la planète, aussi de nombreuses maladies sont transmises par voie fécale ou orale entraînant des maladies de la peau, des difficultés respiratoires et des troubles intestinaux par manque de mesure d'hygiène (Prüss-Üstün et al. 2016). Le traitement des eaux usées représente un défi majeur, car 23 % des décès sont attribuables à la pollution environnementale. Le grand public est inévitablement exposé aux polluants environnementaux.

**Les méthodes d'élimination des polluants\_** Au cours des dernières années, la présence de résidus de pesticides a augmenté de manière significative dans les eaux brutes utilisées pour la production des EDCH. Plusieurs méthodes sont disponibles pour l'élimination des pesticides: la dégradation photo-catalytique (TiO<sub>2</sub>), les procédés d'oxydation, la dégradation aérobie, les membranes de nanofiltration, l'ozonation et la coagulation (Qiang et al. 2010).

L'élimination des pesticides à faibles concentrations ( $\mu\text{g/L}$ ) fait intervenir les réacteurs électrochimiques en fer couplé à l'oxydation par ultraviolet (Yahiaoui et al. 2011), le carbone granulaire électro-activé (Kitous et al. 2016) et les colonnes d'absorption à lit fixe de charbon actif en grains (Alves et al. 2019). L'élimination des molécules organiques de très faible taille fait appel à des procédés de nanofiltration et d'osmose inverse (Ahmad et al. 2010).

Les nutriments apportés par les polluants peuvent être une source d'alimentation et contribuer à la croissance des populations microbiennes en participant à la synthèse de la biomasse. Les méthodes biologiques reposent sur la capacité des micro-organismes à dégrader les substances indésirables en métabolites pour leur apport énergétique. Par conséquent, utiliser des procédés biologiques pour éliminer les polluants représente un faible impact environnemental contrairement aux méthodes chimiques.

Pour les polluants les plus difficiles à métaboliser, la dégradation sera incomplète et conduira à la formation de métabolites non réductible. Ces sous-produits présentent parfois des toxicités supérieures à celle de la molécule mère. Le diuron démontre très bien ce phénomène de toxicité augmentée. Cet herbicide largement utilisé en viticulture produit un composé intermédiaire, le 3,4 dichloroaniline, 100 fois plus toxique (Tixier et al. 2001). Pour éliminer complètement le diuron et son métabolite intermédiaire, pas moins de 6 micro-organismes différents doivent intervenir successivement et parfois simultanément (Figure 23).

Bien que les procédés biologiques soient peu onéreux, ils restent encore insuffisants pour traiter les polluants non biodégradables. De plus, le procédé n'est pas envisageable pour certains composés toxiques qui sont létaux pour les micro-organismes. Seules les méthodes chimiques par oxydation (ozone et chlore) permettent d'éliminer les composés non biodégradables et toxiques. Les procédés d'oxydation avancée (POA), qui emploient des radicaux hydroxyles ( $\bullet\text{OH}$ ) extrêmement réactifs, prennent le relais, ils agissent rapidement et avec une faible sélectivité. Les POA peuvent utiliser le peroxyde d'hydrogène pour générer les  $\bullet\text{OH}$  : les systèmes Fenton  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe(II)}$ , la photolyse  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ , l'ozonolyse  $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$  ou encore la photocatalyse hétérogène  $\text{TiO}_2/\text{UV}$  (García-Montaña et al. 2006). Ce processus pourtant efficace n'est pas utilisé en routine dans les stations d'épuration en raison de son coût élevé, mais il est utilisé comme moyen de secours en cas de dépassement des seuils réglementaires (Oller, Malato, et Sánchez-Pérez 2011).

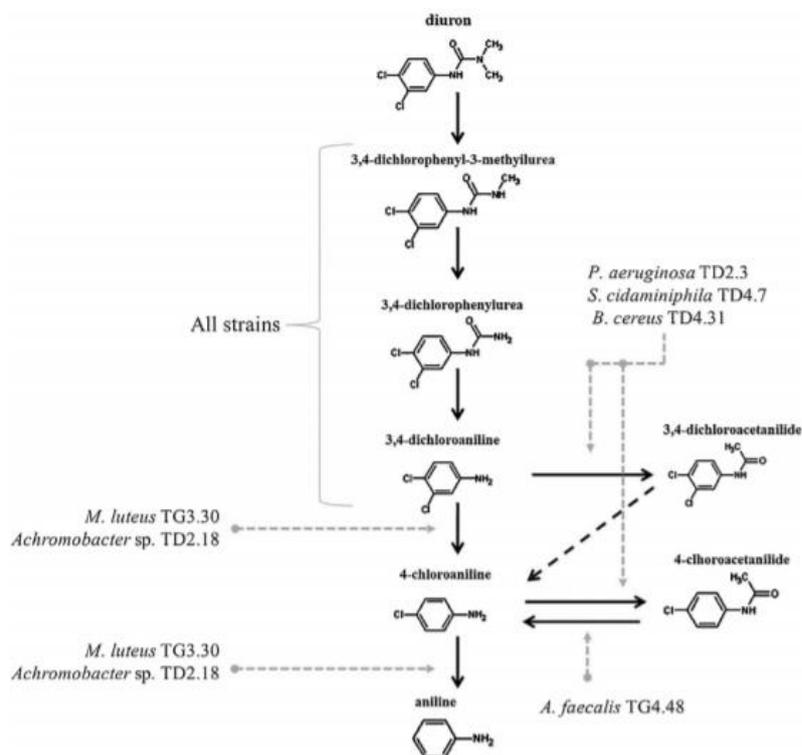


Figure 23. Biodégradation du diuron par des bactéries isolées du sol des cultures de canne à sucre. Figure de Egea et al. 2017.

Les activités industrielles sont également soumises à un contrôle obligatoire des eaux usées. Le choix des méthodes de traitement va dépendre des critères de toxicité et de biodégradabilité des composés retrouvés. Si la molécule a une toxicité inférieure à 50 % et qu'elle est biodégradable, un traitement microbiologique doit être utilisé. Dans tous les autres cas un traitement POA doit être fait jusqu'à obtenir le seuil réglementaire.

### 2.3.3. Processus de dégradation des herbicides

Selon la nature des sols, les résidus de pesticides mettent quelques heures à plusieurs dizaines d'années pour atteindre les eaux souterraines. En chemin, ses résidus peuvent subir des modifications chimiques, être dégradés ou métabolisés par des micro-organismes.

**Dégradation par les micro-organismes\_** L'action des organismes vivants passe par le fonctionnement d'enzymes qui peuvent directement récupérer le carbone du polluant (métabolisme actif) ou activer des enzymes spécifiques à d'autres sources de carbones (co-métabolisme). Le dernier mode d'action possible est la conjugaison, des enzymes catalysent des réactions chimiques entre des pesticides et d'autres molécules présentes dans le sol

(Calvet et al. 2005). La dégradation peut s'arrêter à tout moment, entre la molécule mère et le stade ultime de la dégradation en CO<sub>2</sub> (minéralisation), et conduire à l'accumulation de métabolites. Une étude a démontré que *Candida xestobii* était capable de minéraliser le métolachlore (Mtc) en utilisant l'herbicide comme source de carbone (Munoz et al. 2011). Les polluants oxydés libèrent des électrons qui vont être captés par l'oxygène, le sol doit donc posséder un potentiel redox élevé pour une biodégradation optimale (Figure 24).

La biodégradation est soumise à divers facteurs tels que la température, l'humidité, les UV, l'acidité des sols et la composition en micro-organismes. Par exemple, la dégradation des triazines est plus importante lorsque l'humidité augmente (Ngigi et al. 2011). Les molécules de synthèses contiennent des groupements fonctionnels qui sont peu retrouvés dans la nature donc les réarrangements de structure tendent à rendre les molécules persistantes au vu de leur difficile et lente dégradation. Par exemple l'atrazine (Atz) en condition aérobie peut être totalement minéralisé (Wols et Hofman-Caris 2012). Lors du processus de dégradation, les métabolites déséthyl-atrazine (DEA) et désisopropyl-atrazine (DIA) puis déséthyl-désisopropyl-atrazine (DEDIA) se forment. Mais l'action de la photolyse, ajoute un nouveau sous-produit hydroxylé, l'hydroxy-atrazine (HyA) (Figure 25).

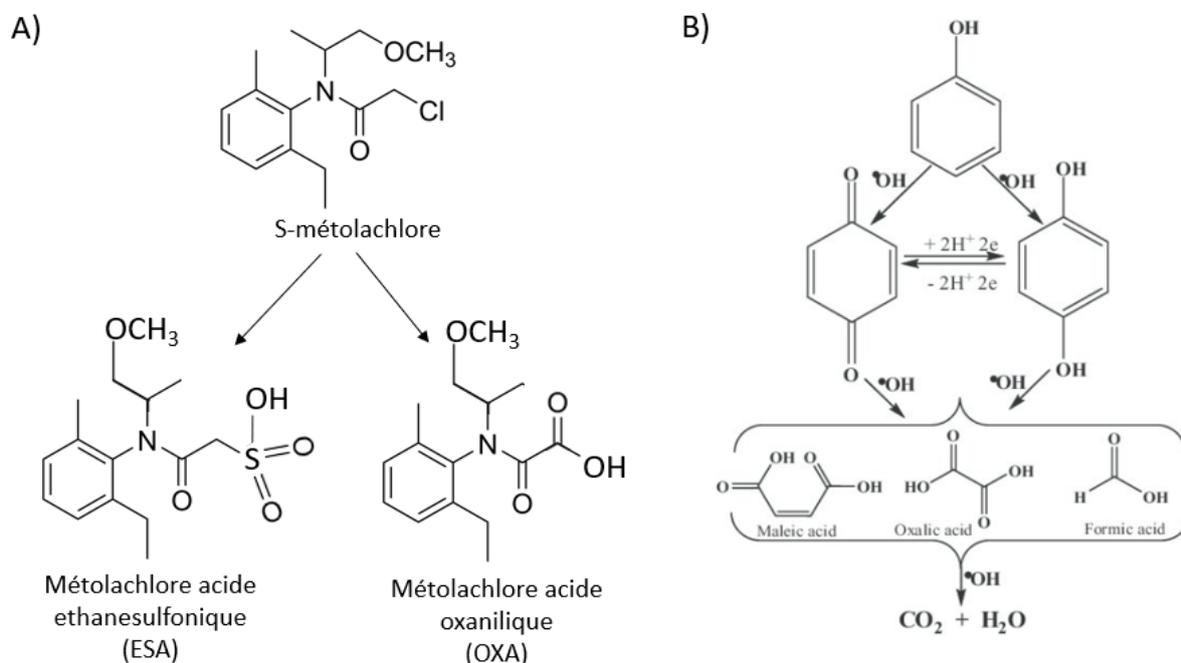


Figure 24. Caractéristiques des métabolites du métolachlore

A) Formule chimique du métolachlore et de ses métabolites. *Figure de Krutz et al. 2006* B) Mécanisme de dégradation du phénol jusqu'à la minéralisation totale. *Figure de Frontana-Urbe et al. 2013.*

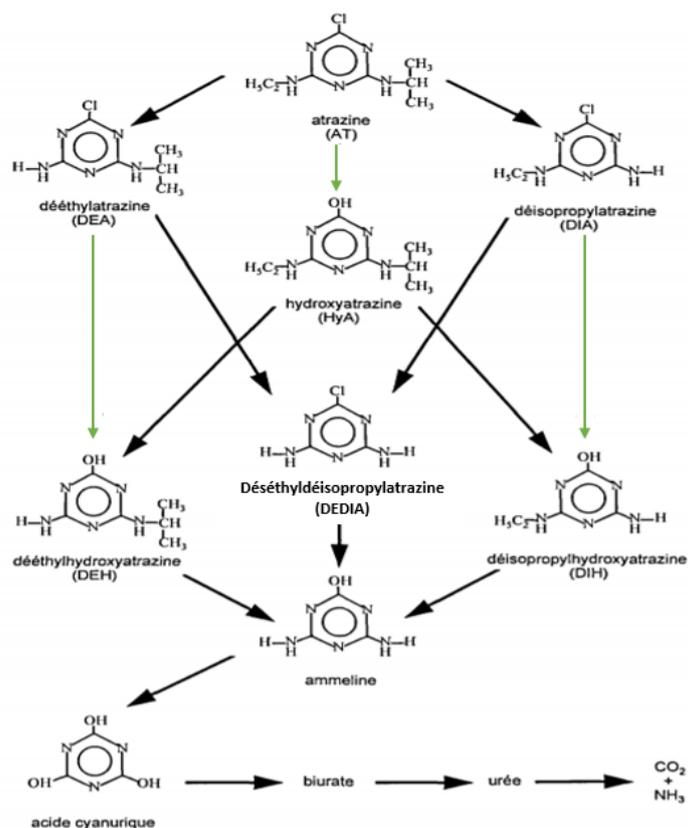


Figure 25. Dégradation de l'atrazine et formation de ses métabolites sous l'action de réactions d'hydrolyse, de photolyse et de réactions d'oxydo-réduction. *Figure de Kruger et al. 1993.*

**La dégradation par réaction chimique\_** Dans les zones où l'activité biologique est réduite comme dans les profondeurs du sol ou les eaux souterraines, des réactions d'hydrolyse, d'oxydo-réduction, de déhydrohalogénéation peuvent avoir lieu. L'hydrolyse correspond à une réaction impliquant le pesticide et une molécule d'eau. L'hydrolyse de l'Atz génère le métabolite 2-hydroxy-atrazine par substitution nucléophile  $\text{Cl}^-$  par  $\text{OH}^-$  et s'accompagne de la formation de HCl (Figure 25). L'hydrolyse de l'Atz est rapide à pH 2, mais quasi inexistante en milieu neutre. Or dans les sols abiotiques proches d'un pH neutre, des hydrolyses de l'atrazine sont retrouvées. Ce phénomène peut s'expliquer par l'interaction entre l'Atz et des cations Fe(III) et Al(III) qui faciliterait l'attaque nucléophile de l'eau (L. Ma et Selim 1996).

Des métabolites sont aussi produits par la chaîne de traitement des eaux dans les stations d'épuration. L'acide amino-méthyl-phosphonique (AMPA) est un métabolite naturel du glyphosate or la dégradation des phosphonates des lessives dans les stations d'épuration conduit aussi à la formation d'AMPA (Grandcoin, Piel, et Baurès 2017). L'ozonation de l'Atz

(Figure 26) conduit à la formation de métabolites retrouvés dans les voies de dégradation naturelle (DEA, DIA, DEDIA, HyA), mais également provoque la formation de nouveaux métabolites (CDAT, ODIT, DIA-Imine).

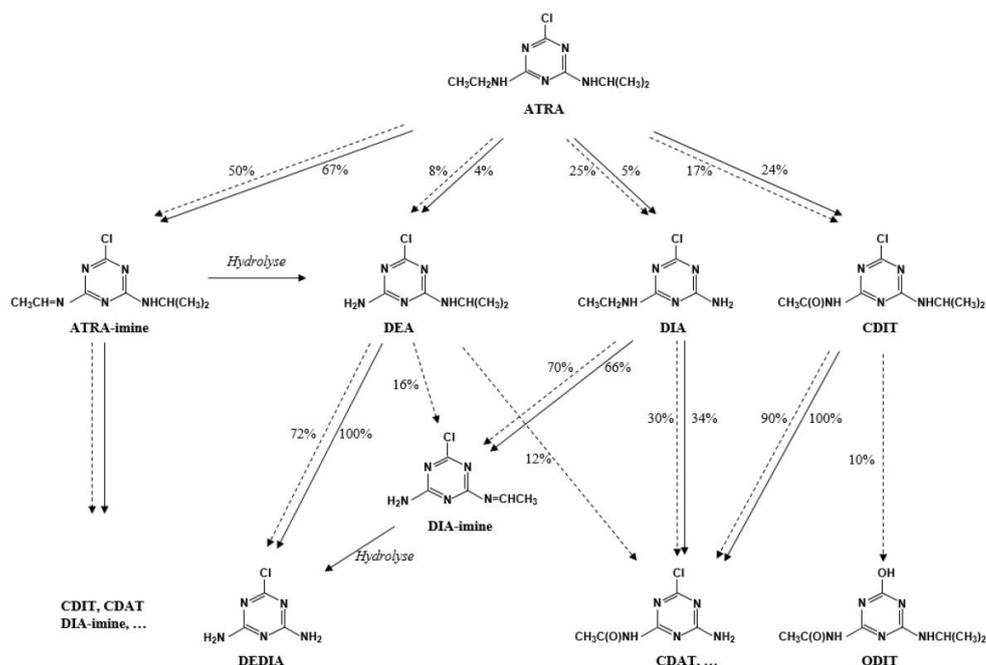


Figure 26. Production des métabolites par ozonation de l'atrazine (Atz). Figure de Avis de l'Anses, Saisine n° 2013-SA-0187

## 2.4. L'exposition aux polluants et à leurs métabolites

### 2.4.1. Analyses des eaux de surfaces et souterraines

**Campagne d'analyse des substances dans les eaux souterraines** \_ En 2011, le nombre de substances recherchées est passé à plus de 400 et le nombre de points de prélèvement a également été augmenté (~500 sites). Ces substances appartiennent à des familles variées comme les molécules phytosanitaires, pharmaceutiques (Tableau 5) et industrielles. Dans cette étude, 42 % des substances recherchées ont pu être quantifiées au moins une fois (Ghestem, Botta and Lopez 2013). Certaines substances attirent l'attention en raison de leur présence à l'échelle nationale (Atz et paracétamol), et d'autres par leur concentration particulièrement élevée dépassent de 10 à 20 fois la norme de 0,1 µg/L (dérivés de l'Atz, métolachlore, bentazone, hydrochlorothiazide, Erythromycine). Cette étude met en évidence le manque d'information sur les moyens de transfert de ces molécules vers les eaux souterraines.

**Tableau 2.** Résultats partiels de la campagne exceptionnelle ESOU métropole pour la détection de produits phytosanitaires et pharmaceutiques

FQ : fréquence de quantification, LQ : limite de quantification, Cmax : concentration maximale

Substances phytosanitaires quantifiées							
Substances	SANDRE	CAS	N analyses	FQ (%)	LQ max (µg/L)	C max (µg/L)	Lot
Deisopropyldeethylatrazine (DEDIA)	1830	3397-62-4	941	41.4%	0.07	2.38	1
Deethylatrazine	1108	6190-65-4	1068	36.2%	0.02	1.9	1
Atrazine	1107	1912-24-9	1068	18.5%	0.02	0.35	1
6-deisopropyl atrazine (DIA)	1109	1007-28-9	1068	8.1%	0.03	0.21	1
Bentazone	1113	25057-89-0	1069	7.9%	0.02	1.18	1
Simazine	1263	122-34-9	1070	6.8%	0.02	0.13	1
Oxadixyl	1666	77732-09-3	1067	4.1%	0.02	0.4	1
Deethylhydroxyatrazine (DEHA)	3159	19988-24-0	941	3.9%	0.05	1.17	1
Diuron	1177	330-54-1	1070	3.7%	0.02	0.18	1
2,6-dichlorobenzamide (BAM)	2011	2008-58-4	1067	2.9%	0.02	0.42	1
Metolachlor	1221	51218-45-2	1070	2.8%	0.02	0.95	1

Substances pharmaceutiques quantifiées							
Substances	SANDRE	CAS	N analyses	FQ (%)	LQ max (µg/L)	C max (µg/L)	Lot
Acetaminophen (paracetamol)	5354	103-90-2	954	26.9%	0.005	0.481	2
Carbamazepine	5296	298-46-4	954	14.7%	0.005	0.083	2
Metformine	6755	657-24-9	954	7.8%	5	1.577	2
Tramadol	6720	27203-92-5	954	7.3%	0.005	0.176	2
Oxazepam	5375	604-75-1	953	4.3%	0.005	0.04202	2
Acetylsulfamethoxazole	5356	723-46-6	954	3.2%	0.005	0.043	2
Erythromycin	6522	114-07-8	954	2.5%	0.005	1.872	2
Sotalol	5424	3930-20-9	954	2.5%	0.005	0.051	2
Isoquinoline	6643	119-65-3	954	2.3%	0.01	0.033	2
Codeine	6683	76-57-3	954	1.9%	0.2	0.1	2
Metronidazole	6731	443-48-1	954	1.7%	0.005	0.596	2
O-desmethyiltramadol	6767	73986-53-5	954	1.6%	5	0.05	2
Trimetazidine	6732	5011-34-7	954	1.6%	0.005	0.035	2
Fenofibric acid	5369	26129-32-8	954	1.4%	0.005	0.149	2
Ketoprofen	5353	22071-15-4	954	0.8%	0.005	0.354	2
Hydrochlorothiazide	6746	58-93-5	953	0.7%	0.025	2.46	2

**Campagne d'analyse des substances dans les eaux de surfaces\_** En 2012, un total de 232 substances ont été recherchées dans la matrice « eau » ou dans la matrice « sédiment ». L'étude révèle l'importance de la contamination des eaux de surface par les pesticides (90/232) avec notamment la présence des métabolites du Mtc sur plus de 50 % des points de mesure. Par ailleurs, les analyses dans les sédiments ont montré une forte présence en pendimenthaline, reconnue comme perturbateur endocrinien. Un grand nombre de médicaments (50/232) ont ainsi été quantifiés comme la carbamazépine, l'oxazépam ou le kétoprofène.

**Comparaison des campagnes\_** Le rapport présenté par Dulio et Andres en 2013 révèle la contamination importante de l'eau sur l'ensemble du territoire français par les métabolites de substances phytosanitaires. Les molécules de cette famille ont été non seulement fréquemment quantifiées, mais aussi ont montré des concentrations très élevées (supérieures à 0,1 µg/L). A l'inverse, pour la famille des médicaments bien qu'elle soit fréquemment retrouvée, les concentrations restent faibles dans les deux conditions (Figure 27).

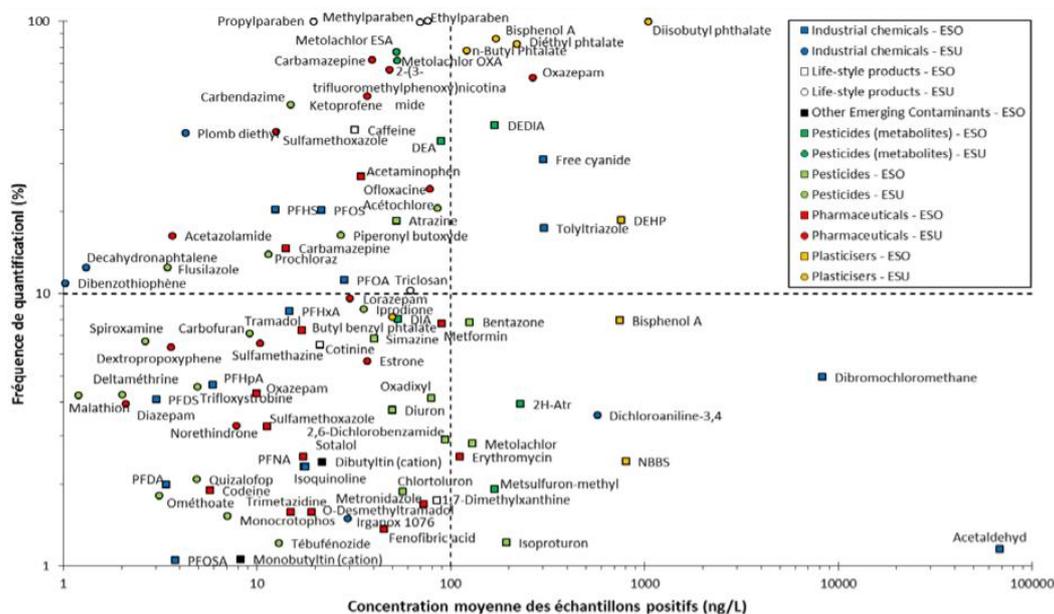


Figure 27. Fréquence et quantification des polluants dans les eaux de surface et souterraines. Figure de Baran et al. 2011.

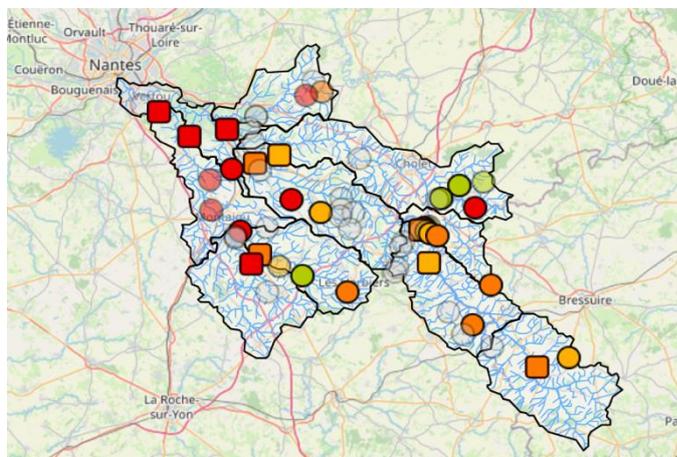
Position des molécules recherchées lors des campagnes exceptionnelles eaux souterraines (ESO – 2011) et eaux de surface (ESU – 2012) dans la matrice. Comparaison de la « fréquence de quantification (%) et de la concentration moyenne des échantillons positifs (ng/L) ».

#### 2.4.2. Analyse de l'eau de consommation humaine

Les études de conformité de l'eau à l'échelle régionale sont de plus en plus médiatisées. Un article de Ouest France paru le 28 avril 2021 montre que près de 1 million de consommateurs, principalement localisés en milieu rural, reçoivent une eau non conforme selon les données communiquées par l'ARS sur la qualité de l'eau. Parmi le million de consommateurs, 450 000 boivent une eau qui dépasse les normes maximales en matière de pesticide, soit une eau qui excède 0,5 µg/L pour la somme des substances actives analysées et 0,1 µg/L par substance active. Un des problèmes soulevés est la disparité géographique des substances recherchées. En effet, l'Etat fournit une liste de 750 pesticides potentiels à tester, mais l'ARS réduit cette liste en tenant compte des spécificités de culture régionale. Le nombre à tester varie énormément selon les ARS. Par exemple 12 pesticides sont recherchés dans l'Aisne contre 609 dans le Var.

En région Pays de la Loire, en 2019, 161 pesticides sont retrouvés sur les 721 substances actives recherchées. De plus, sur les 24 stations contrôlées en Loire-Atlantique pour leur teneur en pesticides, une seule station répond à l'objectif de qualité. Sur la Figure 28 sont

représentées les stations avec moins de 10 % (vert) – 10 à 40 % (jaune) – 40 à 80 % (orange) et plus de 80 % (rouge) de dépassement des seuils en pesticides.



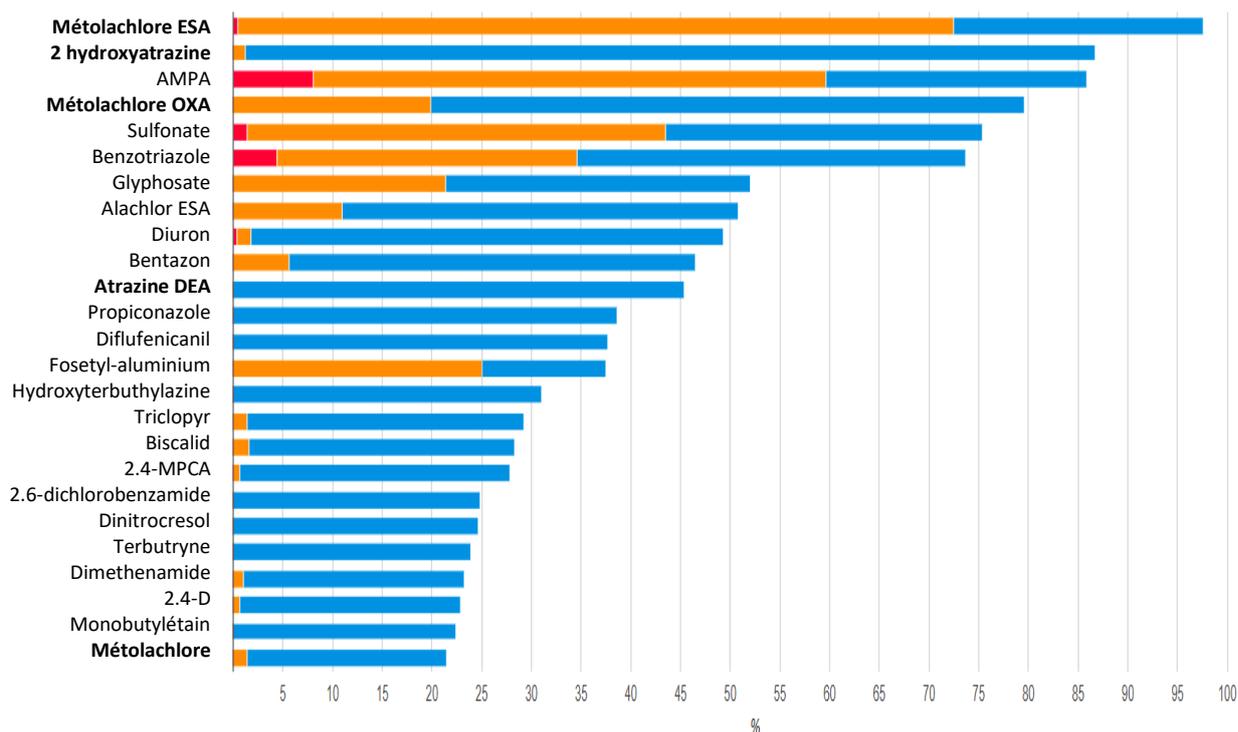
**Figure 28.** Carte des 24 stations de traitement de l'eau évaluée en Pays de la Loire. *Carte de Hub eau (EPTB Sèvre Nantaise)*

Station dépassant le seuil réglementaire. En vert (moins de 10 %), en jaune (de 10 à 40 %), en orange (de 40 à 80 %) et en rouge (+ de 80 %)

Si l'on s'attarde plus particulièrement aux 25 substances ayant le taux de quantification le plus élevé, nous découvrons qu'un grand nombre de pesticides interdits d'utilisation sont toujours présents dans les sols et qu'ils sont difficilement biodégradables. C'est le cas du diuron, une molécule interdite depuis 2008 retrouvée à une fréquence de 50 % et pour laquelle nous ne retrouvons pas les métabolites de dégradation dans les analyses. À l'inverse, le 2-hydroxyatrazine est quantifié dans 87 % des analyses, mais dépasse rarement les seuils de potabilité, c'est un métabolite de l'Atz, une molécule interdite depuis 2003.

La comparaison des molécules mères et de leur métabolite est un indicateur précieux de suivi. L'analyse révèle que l'AMPA est fortement présente, et qu'elle dépasse à hauteur de 8 % les valeurs seuils dans les eaux brutes (2 µg/L) et de 51 % les valeurs de potabilités de l'eau distribuée (0,1 µg/L). La molécule mère correspondant à l'AMPA est le glyphosate, les analyses nous indiquent qu'il est plus souvent détecté le métabolite que la molécule mère (85 % contre 51 %), ce qui signifie une bonne biodégradabilité du glyphosate, mais une forte persistance du métabolite (Figure 29).

Le cas du Mtc et de ses métabolites est intéressant ici. L'ESA est quantifié dans 97 % des analyses et dépasse à hauteur 72 % le seuil de potabilisation de l'eau distribuée. L'OXA est quantifié dans 80 % des analyses et dépasse le seuil de potabilité 19 % du temps. Il est intéressant de relever ici que la molécule mère est très utilisée en agriculture, mais qu'elle se dégrade rapidement dans les sols. Ces métabolites sont très persistants et doivent donc être suivis.



**Figure 29.** Qualité de l'eau en Région Pays de la Loire. *Figure de Hub eau EPTB Sèvre Nantaise*  
 En rouge est indiquée la proportion d'analyses dépassant le seuil "eau brute" de 2 µg/L ; en orange la proportion dépassant le seuil de potabilisation "eau distribuée" de 0,1 µg/L et en bleu la proportion ne dépassant pas 0,1 µg/L. <https://www.sevre-nantaise.com/observatoire/qualite-eau-pesticides>.

Ces analyses sont cohérentes avec les résultats obtenus dans d'autres régions de France. En 2015, ces mêmes molécules ont été quantifiées et avec des concentrations importantes pour l'ESA (3,6 µg/L). Néanmoins, d'autres régions de France possèdent des teneurs en Atz et ses métabolites bien plus élevés. Par exemple le métabolite DEDIA qui est peu retrouvé en Région Pays de la Loire est de 2,4 µg/L dans le Limousin (Guibal et al. 2018) .

Malgré les efforts déployés dans les stations d'épuration, les différents moyens de remédiation mis en œuvre pour limiter les pesticides dans les EDCH ne suffisent pas à garantir le respect des 0,1 µg/L. Les analyses de l'eau brute (après captage) et de l'eau distribuée témoignent de ces difficultés (Tableau 3). Les procédés de traitement à Saint-Gein (filtres à charbon actif en grain et ajout de chlore) ne présentent pas l'efficacité nécessaire pour réduire la concentration des métabolites de l'alachlore (ALCL) et du métolachlore (Mtc) en dessous de la limite de qualité.

**Tableau 3.** Résultats d'analyses (en µg/L) du captage et de l'UDI desservie à Saint-Gein 2013

Installations	Molécules (µg/L)			
	ALCL-ESA	ALCL-OXA	Mtc-ESA	Mtc-OXA
Captage (eau brute)	2,00	< 0,05	5,60	0,16
Eau distribuée	1,10	< 0,05	2,50	0,07

En ce qui concerne les eaux en bouteille, l'eau est issue de sources naturelles donc elle est probablement impactée par les pollutions diffuses. En 2015, le laboratoire d'hydrologie de Nancy a recherché 10 métabolites de pesticides fréquemment retrouvés dans les eaux du robinet. Il est apparu que très peu de ces métabolites ont pu être quantifiés. Quand cela a été le cas, les métabolites du Mtc et de l'Atz représentaient une fréquence inférieure à 10 % contrairement aux eaux du robinet. De plus, les concentrations ne dépassent pas les seuils de potabilité (Tableau 4). La qualité des eaux de source est par conséquent meilleure au regard de ces molécules testées. Pour expliquer cette différence, il faut tenir compte de la géographie, les eaux de source sont captées en altitudes où peu d'activité agricole est faite, par conséquent le rejet dans l'environnement en montagne est très faible.

**Tableau 4.** Métabolites de pesticides recherchés dans les eaux de source en bouteille commercialisées en 2014 par le laboratoire d'hydrologie de Nancy.

Substances	Nombre d'analyses	Nombre de quantification	Fréquence de quantification	Cmax en µg/L
Mtc-ESA	79	7	9 %	0,068
DEA	79	4	5 %	0,020
2-hydroxy-Atz	79	3	4 %	0,030
DEDIA	79	1	1 %	0,021
Mtc-OXA	79	1	1 %	0,030
DIA	79	0	-	-

N.B Aucun métabolite de pesticide n'a été quantifié dans des eaux de source gazeuses ou dans des eaux rendues potables par traitement.

## 2.5. Les effets des triazines et des chloroacétamides

La question du rôle des polluants dans le développement des maladies chroniques et métaboliques est soulevée. Des liens ont pu être établis entre les facteurs externes (chimiques, stress, alimentation, etc.) et l'apparition de symptômes allergiques ou de

déséquilibre du microbiote par exemple sans que l'on puisse affirmer qu'ils en sont la cause. La pollution diffuse semble être un facteur supplémentaire à prendre en compte dans les maladies chroniques.

Face à la grande diversité de polluants présents dans les sols et l'eau du robinet, les études scientifiques pour comprendre leurs effets sur l'environnement et l'Homme se multiplient. Nous avons pu constater que les triazines et les chloroacétamides sont deux familles d'herbicides fréquemment quantifiées dans la région Pays de la Loire. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à ces molécules.

### 2.5.1. *L'atrazine*

La famille des triazines est structurellement composée d'un hétérocycle aromatique. Les dérivés de triazine agissent sur de nombreuses cibles (plantes, champignons, bactéries, virus) et ils ont des activités anti-inflammatoires, anticancéreuses et antiulcéreuses (Kushwaha et Sharma 2020). La spécificité des herbicides est d'agir sur la chaîne de transport des électrons en bloquant la photosynthèse des plantes. L'action peut se faire au niveau du complexe PSII, ce qui a pour conséquence l'arrêt de la synthèse de composés sucrés. La surcharge en électron entraîne la formation de ROS amenant à la mort des cellules végétales. Il peut aussi agir sur la protéine PsaC au niveau du complexe PSI et former des ions superoxydes et du peroxyde d'hydrogène létaux pour les cellules (Wilkinson et al. 2015). Cette famille comprend de nombreuses molécules telles que ametryn, cyanazine, prometryn, propazine, simazine, simetryn, terbuthylazine et atrazine.

L'atrazine est un produit phytopharmaceutique de synthèse breveté en Suisse en 1958 et commercialisé dans le monde entier (Annexe III). Cependant, son utilisation a été controversée puisqu'il a été détecté dans le sol, les plantations, les réservoirs utilisés pour l'approvisionnement public en eau, les eaux souterraines, les ruisseaux, les lacs, les rivières, les mers et même les glaciers dans les régions éloignées (Nödler, Licha, et Voutsas 2013).

Considérant sa faible biodégradabilité (Figure 30) et son fort impact sur la vie aquatique, il a été interdit d'utilisation dans l'Union Européenne en 2003. Il reste cependant fortement employé aux Etats-Unis, en Chine, au Brésil et en Inde. Les métabolites de l'Atz ont une structure chimique distincte de la molécule mère. Par conséquent ils peuvent présenter des propriétés physico-chimiques différentes dans l'environnement. Si l'on remplace l'atome de

chlore de l'Atz par une fonction hydroxyle (OH) cela donne le métabolite 2-hydroxyatrazine qui est plus soluble dans l'eau que l'Atz. De plus, il présente une meilleure affinité pour la matière organique donc sa rétention est plus grande. A l'inverse, quand on élimine le groupe alkyle de l'Atz, cela conduit aux métabolites DEA et DIA. Dans ce cas, l'affinité pour la matière organique est diminuée ainsi le transfert vers les eaux souterraines est plus rapide.

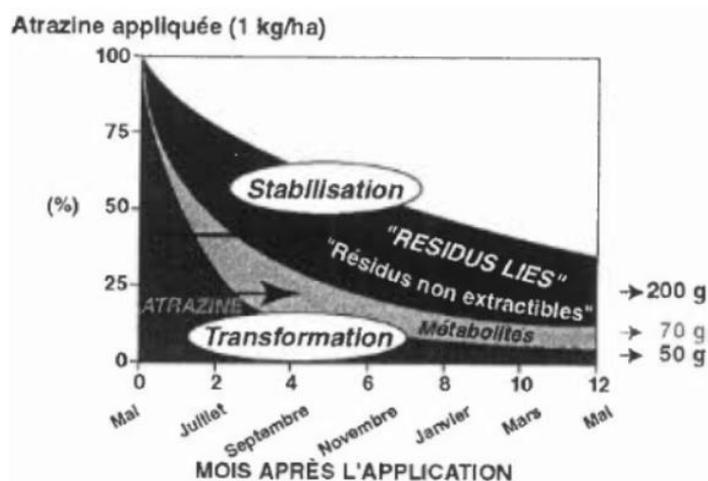


Figure 30. Cinétique de dissipation de l'atrazine dans un champ et apparition des produits de transformation. Figure de Barriuso et Koskinen 1996.

L'Atz présente une toxicité aiguë pour l'algue verte d'eau douce *Scenedesmus obliquus* et le cladocère *Daphnia carinata* (He et al. 2012). Il a été montré toxique pour les poissons *Poecilia reticulata* et *Carassius carassius*, les amphibiens et les reptiles (Solomon et al. 2008). La toxicité de l'Atz a été confirmée sur les branchies et la rate du tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) (Oliveira et al. 2018).

Il semble que l'Atz touche particulièrement le système endocrinien. Une féminisation partielle a été retrouvée chez les poissons, les amphibiens et les reptiles lorsqu'ils sont exposés à fortes doses en Atz durant leur développement (Hayes et al. 2011). L'altération des tissus reproducteurs est aussi marquée par des effets épigénétiques. Des régions de méthylation différentielle de l'ADN ont été associées aux maladies transgénérationnelles du sperme (Thorson et al. 2020). La modification des schémas de méthylation de l'ADN induisant la reprogrammation des processus de développement est liée à l'hérédité des altérations épigénétiques (Anway et al. 2005). Néanmoins les effets génotoxiques de l'Atz sur les organismes aquatiques sont plutôt rares. Quelques cas de cassures des brins d'ADN dans les érythrocytes de *C. auratus* ont été relevés (Cavas 2011).

Dans les études de toxicité aiguë réalisées chez l'animal, l'Atz a provoqué une toxicité pour le développement chez le lapin (Scialli, DeSesso, et Breckenridge 2014). L'Atz déclenche le stress oxydatif hépatique et l'apoptose chez les cailles *Coturnix c. coturnix* (C. Zhang et al. 2017). Cette fois, dans les études de toxicité chronique, l'Atz est responsable d'une cardiotoxicité chez le chien (WHO guidelines for drinking-water quality 2003). Les études *in vitro* ont démontré l'effet génotoxique de l'Atz dans les cellules ovariennes de hamster chinois, mais sans montrer de relation dose/réponse convainquante (Gammon et al. 2005).

L'Atz peut être convertie en N-nitrosoatrazine génotoxique dans l'environnement ou dans le système digestif, ce qui suggère que les N-nitrosamines dérivées des triazines pourraient être oncogènes. Bien que certaines études aient affirmé que l'exposition à l'Atz entraîne un risque élevé de cancer de la prostate, les incidences relevées ne sont pas concluantes (Gammon et al. 2005). Une étude sur des rats Sprague-Dawley femelles exposées à l'Atz, qui montrait un vieillissement prématuré du système reproducteur et une augmentation du développement de tumeur maligne au niveau des glandes mammaires n'a pas été jugée pertinente en raison de la spécificité des résultats à la souche, au sexe et à l'espèce (Solomon et al. 2008). Il en est de même concernant une étude épidémiologique sur le développement de cancer du sein (Simpkins et al. 2011). Néanmoins l'association entre l'exposition à l'Atz pendant la gestation et la prévalence des naissances prématurées et des naissances de petite taille reste suspectée (Ochoa-Acuña et al. 2009). C'est pourquoi, le CIRC considère l'Atz comme « inclassable quant à sa cancérogénicité ».

Les effets de l'Atz sur la santé humaine ne sont pas encore élucidés et il convient de rester prudent lors de son utilisation. Le dosage des métabolites urinaires de l'Atz chez des enfants d'agriculteur et des enfants moins exposés montre une présence significativement plus élevée pour les enfants régulièrement en contact de l'Atz (Curwin et al. 2010).

### 2.5.2. Le métolachlore

Les herbicides à base de chloroacétamide inhibent l'élongase des acides gras à très longue chaîne (supérieure à 18 carbones). En intervenant tôt dans les étapes de synthèse d'acides gras, la formation des lipides est bloquée. La diminution de la production des acides gras perturbe le développement des repousses en inhibant la division cellulaire (Götz et Böger

2004). Cette famille regroupe entre autres les composés alachlore, butachlore, diméthachlore, métazachlore et métolachlore (Mtc).

Le Mtc est composé d'un mélange racémique d'isomères R et d'isomères S. Seul l'isomère S est actif, c'est pourquoi, en 2003 le Mtc a été interdit dans l'Union européenne au profit du S-métolachlore (S-Mtc). Le S-Mtc a permis de diminuer de 35 % les doses utilisées pour obtenir un contrôle des mauvaises herbes identiques à celle du Mtc racémique (Shaner et al. 2006). Il n'induit pas d'accumulation phytotoxique, car les plantes le métabolisent rapidement. Par contre, le S-Mtc altère la croissance cellulaire et réduit la division cellulaire des plantes et de certaines souches de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) sans pour autant avoir un effet fongicide (Gil et al. 2018).

Les acides sulfoniques (ESA) et oxaniliques (OXA) du S-Mtc sont les deux produits issus de la dégradation très retrouvés dans l'environnement (Figure 24A). Les propriétés physico-chimiques du S-Mtc font du composé un élément volatil dans l'air et persistant dans les sols (Bedos et al. 2017) (Annexe IV). Les conditions environnementales influençant l'activité microbienne affectent également la persistance du S-Mtc dans le sol. Une étude de la minéralisation du S-Mtc a montré qu'en stimulant les populations microbiennes, la demi-vie du Mtc était diminuée ( $t_{1/2} = 100$  jours à 5 °C et  $t_{1/2} = 5,7$  jours à 35 °C) (Dinelli et al. 2000). Le S-Mtc est très soluble dans l'eau donc facilement absorbé dans le sol. Une étude du BRGM a démontré que ses métabolites étaient présents plus profondément dans les sols, ce qui confirme que le lessivage est plus important pour les métabolites que pour la molécule mère (Baran et al. 2011).

Le S-Mtc et ses produits de dégradation ont un impact sur les huîtres, les algues, les poissons et les écrevisses (Mai et al. 2013 ; Stara et al. 2019 ; Machado et Soares 2021 ; L. Yang et al. 2021). Une exposition chronique dans les rivières et les mers conduit à des modifications du développement des huîtres avec une augmentation du pourcentage de dommage à l'ADN au stade larvaire. Dans cette étude, le S-Mtc semble plus embryotoxique et génotoxique que ses produits de dégradation (Mai et al. 2014). Des écrevisses marbrées (*Procambarus virginialis*) exposées à des concentrations de 1,1- 11 et 110 µg/L ont vu leur mortalité augmenter dès les premiers stades de leur vie. L'activité métabolique (SOD, CAT, GST) semble plus impactée avec une faible concentration en S-Mtc. De plus, l'épithélium tubulaire de l'écrevisse a fortement été désorganisé (Stara et al. 2019). Des concentrations élevées

peuvent interférer avec la capacité des écrevisses à recevoir ou à répondre aux signaux sociaux et donc affecter certains comportements (Cook et Moore 2008).

L'effet du S-Mtc à forte dose (100 µg/L) sur la transcription des gènes liés au système thyroïdien chez le poisson *Oryzias latipes* a montré une perturbation de l'axe hypothalamus-pituitaire-thyroïde (Jin et al. 2011). Chez d'autres espèces de poisson comme la carpe (*Carassius carassius*), le S-Mtc n'induit que de faible dommage à l'ADN. Les effets génotoxiques sont suspectés d'être plutôt engendrés par une association de plusieurs pesticides (Polard et al. 2011). Des études combinant plusieurs polluants comme les métaux lourds et les chloroacétamides ont eu des effets synergiques délétères sur des algues et des poissons (T. Zhang et al. 2019) (W.-D. Cai, Liu, et Fang 2012). L'exposition au S-Mtc a également été associée à une diminution de la taille du corps des grenouilles *Rana catesbeiana* (Bérubé et al. 2005).

Dans l'ensemble, les études suggèrent qu'entre deux phénomènes de ruissellement, la contamination des cours d'eau reste faible. Lorsque des concentrations élevées sont observées, elles ne constituent pas de risque de toxicité aiguë pour la vie aquatique. Le bruit de fond des herbicides quand ils sont pris de façon isolée ne présente pas plus de risque de toxicité chronique évident. Néanmoins les effets synergiques des molécules en « cocktail » ne sont pas suffisamment investigués (Guibal et al. 2018).

L'herbicide provoque des changements dans l'expression des hormones de la reproduction des rats mâles (F. T. Mathias et al. 2012). Des embryons de poulet exposés au S-Mtc ont eu une diminution significative de leur masse corporelle moyenne (Várnagy et al. 2003). Les premiers tests de mutagénicité en 1997 montraient que le S-Mtc n'était ni mutagène pour les cellules microbiennes ni chez les animaux. De même, il n'y avait aucune preuve de dommages/réparation de l'ADN dans les hépatocytes récupérés chez les rats traités (Dearfield et al. 1999). Depuis il ne semble pas y avoir de consensus pour le métolachlore dans la littérature. Les traitements au S-Mtc à faible dose ont induit une augmentation marquée de la prolifération des hépatocytes tandis que des concentrations plus élevées ont induit des effets hépatotoxiques, mais non génotoxiques.

Tandis qu'une étude rapporte une activité respiratoire des mitochondries du foie altérée par le S-Mtc (S. P. Pereira et al. 2009), une autre fait mention du faible effet du S-Mtc sur

l'induction de tumeur du foie (Dearfield et al. 1999). L'exposition au S-Mtc semble augmenter l'activité du cytochrome p450 CYP2B1/2 et CYP3A1/2 dans les cellules de foie de rat Sprague Dawley (Dalton, Miller, et Meyer 2003) et l'activité de l'aromatase (CYP 19) dans les cellules de choriocarcinome JEG-3 (Laville et al. 2006). Cependant, une étude fait mention de la réduction de l'activité du cytochrome p450 et de la glutathion S-transférase chez *Chironomus tentans* (Jin-Clark, Anderson, et Zhu 2008).

En raison des effets non ciblés du S-Mtc observés sur des modèles très différents, il est nécessaire de regarder les études épidémiologiques pour comprendre et appréhender les effets du S-Mtc sur l'Homme. L'exposition professionnelle aux pesticides peut augmenter le risque parental d'infertilité et d'issue défavorable de la grossesse (Barr et al. 2010). Le dosage des métabolites urinaires du S-Mtc nous indique que l'exposition à ce composé n'augmente pas l'incidence aux pathologies chroniques, mais fait le lien entre des cancers et le métolachlore. L'organisme américain EPA (environmental protection agency) le classe comme « Cancérogène possible pour l'Homme » en raison d'étude montrant le développement de cancer du foie et de lymphome à cellules folliculaires chez les agriculteurs fortement exposé à cette molécule. L'exposition au S-Mtc a montré quelques signes de réponse pour le cancer du poumon également, mais n'a pas été confirmée dans les nouvelles cohortes (Silver et al. 2015). Une association probable entre le cancer des os et le S-Mtc a été décrite (Thorpe et Shirmohammadi 2005). Enfin il a été relevé une plus forte incidence de cancer du côlon chez les hommes ayant déjà utilisé du S-Mtc (Andreotti et al. 2010).

Les métabolites du S-Mtc n'ont été évalués que récemment. L'ANSES a réalisé deux synthèses à propos de la pertinence pour les eaux destinées à la consommation humaine pour les métabolites OXA et ESA en 2018 et 2020. Le métabolite OXA n'est pas considéré comme pertinent suite aux résultats négatifs obtenus lors des tests de génotoxicité, toxicité de la reproduction, perturbation endocrinienne. Pourtant l'ANSES confirme le manque d'information concernant l'effet cancérogène de ce métabolite. Les études de génotoxicité de l'ESA montrent des résultats équivoques pour 2 des 3 tests donc les autorités considèrent « qu'il n'est toujours pas possible d'exclure formellement un effet mutagène ou génotoxique du ESA » c'est pourquoi il est considéré comme pertinent pour les EDCH et doit donc impérativement ne pas dépasser 0,1 µg/L.

## **Chapitre 3 : Comment étudier les effets de ces xénobiotiques ?**

Dans ce chapitre, nous allons revenir sur les différentes méthodes à la disposition des chercheurs permettant d'évaluer le comportement des xénobiotiques vis-à-vis du tractus digestif. La voie orale concerne aussi bien les polluants que les médicaments. Résister aux conditions du tractus gastro-intestinal permet d'arriver à la barrière intestinale intacte et en capacité d'exercer une action qu'elle soit positive ou négative. Des outils ont, dans ce sens, été développés pour modifier les molécules thérapeutiques et ainsi favoriser leur action par voie orale. Nous verrons l'évolution des modèles mis en œuvre dans le cadre des études sur la perméabilité membranaire intestinale.

### **1. Les modèles développés pour l'étude de la stabilité gastro-intestinale d'un xénobiotique**

L'étude de la biodisponibilité de xénobiotiques après une administration orale est dépendante du tractus gastro-intestinal. Par conséquent, un ensemble de facteurs comme la solubilité et la dissolution du xénobiotique est influencé par la composition variable des fluides intestinaux et gastriques dépendant des variations naturelles biologiques ou de la prise alimentaire (à jeun ou postprandial). L'objectif est alors d'imiter les fluides salivaires, gastriques et intestinaux avant et après un repas pour s'affranchir des études sur les animaux.

Afin de mimer le plus fidèlement les deux processus qui ont lieu lors de la traversée du tractus digestif, il faut tenir compte des transformations mécaniques qui réduisent la taille des particules alimentaires et des transformations enzymatiques qui hydrolysent les macromolécules en molécules de plus petite taille. Les modèles dynamiques peuvent appliquer des forces de frottement et de cisaillement capable de remplir le premier processus mécanique. En revanche, seule la transformation métabolique a lieu dans les modèles statiques. Ces modèles doivent alors être modulables, précis et reproductibles (Vatier, Célice-Pingaud, et Farinotti 1998).

### 1.1. Les modèles statiques

Les compartiments, oral, gastrique et intestinal, n'ont pas les mêmes caractéristiques physico-chimiques de temps de transit, de pH, de sécrétions, de conditions enzymatiques et de microbiote.

*La salive\_* Les xénobiotiques dans la cavité orale peuvent, dès à présent, traverser la muqueuse sublinguale ou buccale. Les xénobiotiques à ce niveau ne sont pas exposés au pH acide ni aux enzymes gastro-intestinales. De plus, les xénobiotiques contournent le passage hépatique et ne sont pas au contact de produits toxiques. Les xénobiotiques ne sont pas autant dégradés quand ils rejoignent la circulation générale. L'action de dégradation partielle des xénobiotiques passe par la mastication et la sécrétion de fluides par les glandes salivaires. Le pH varie dans le temps et en fonction de l'apport alimentaire et des conditions de vie de l'individu (consommation de tabac, traitements médicamenteux, régime alimentaire, etc.) (Kartal et al. 2010).

Une salive saine est entre pH 6 et 7,4. Elle est composée d'un agent tampon comme le bicarbonate. Il n'existe pas de modèle consensus car la composition des milieux mimétiques est adaptée à chaque étude, par exemple pour la corrosion dentaire, pour les effets carcinogènes de composés ou pour les études d'interactions entre molécules (J. Ali et al. 2021; Hoebler et al. 2002).

*Le liquide gastrique\_* Le pH de l'estomac varie entre 1 et 5 en fonction de l'apport en aliments. L'ingestion de nourriture déclenche automatiquement une augmentation du pH du milieu gastrique. A jeun, l'estomac a un pH inférieur à 2 puis selon les types d'aliments ingérés le pH peut varier d'un repas à un autre, allant de pH 4 à 7. La simulation du milieu gastrique doit donc tenir compte de ces deux périodes.

Vertzoni et al. ont mis au point un milieu synthétique gastrique qui reflète la physiologie de l'état de jeûne appelé FaSSGF (fasted-state simulated gastric fluid), ce milieu est enrichi de la principale enzyme de digestion gastrique la pepsine à 0,1 mg/mL, et de faibles quantités de sels biliaires (Vertzoni et al. 2005). En condition postprandiale, 3 milieux ont été développés pour refléter la variation de pH et d'osmolarité au cours des 75 premières min(début), de 75 à 165 min (milieu) jusqu'à la fin de la digestion à plus de 165 min. Ces milieux postprandiaux

sont nommés FeSSGF (Baxevanis, Kuiper, et Fotaki 2018). Le tableau 5 résume la composition et les propriétés de chaque milieu.

**Tableau 5.** Milieu mimant le fluide gastrique à jeun (FaSSGF) et postprandial (FeSSGF)

Composition (mM)	FaSSGF	FeSSGF		
		0-75min	75-165 min	>165 min
Taurocholate de sodium	0.08	-	-	-
Lécithine	0.02	-	-	-
Chlorure de sodium	34.2	148	237.02	122.6
Acide acétique	-	-	17.12	-
Acétate de sodium	-	-	29.75	-
Acide orthophosphorique	-	-	-	5.5
Dihydrogène Phosphate de sodium	-	-	-	32
Lait/milieu	-	1 :0	1 :1	1 :3
Acide hydrochlorique		Ajustement du pH		
<b>Propriétés</b>				
pH	1.6	6.4	5	3
Osmolarité (mOsm/kg)	120.7±2.5	559	400	300
Tampon (mmol/L/pH)	-	21.33	25	25

*Le liquide intestinal* \_ Avant la vidange du contenu de l'estomac dans l'intestin grêle, le pH duodéal remonte à un pH d'environ 6,5 puis diminue progressivement avec l'arrivée du contenu acide de l'estomac. Dans l'intestin grêle distal (iléon), le pH est neutre ~7.5 grâce à la sécrétion de bicarbonate. Au cours du trajet dans l'intestin grêle, la formation d'acides gras à chaîne courte obtenus par fermentation diminue le pH jusqu'au côlon ascendant pour se placer entre pH 6-8. La sécrétion de sels biliaires et de lécithines est plus importante dans l'intestin et d'autres enzymes de digestion sont retrouvées comme la trypsine, la chymotrypsine, la lipase ou l'amylase. Le cocktail de ces quatre enzymes est réuni dans l'extrait de pancréatine.

De la même manière que pour l'estomac, des milieux différents ont été développés pour améliorer les prédictions *in vitro*. Le liquide synthétique intestinal à jeun (FaSSIF), le liquide synthétique intestinal postprandial (FeSSIF) ainsi que le liquide synthétique du côlon sont reportés dans le Tableau 6 (Vertzoni et al. 2010).

L'utilisation de ces milieux dans les systèmes Transwell peut améliorer la pertinence du modèle d'absorption orale en les ajoutant dans la chambre apicale (Kataoka et al. 2003).

Cependant les Caco-2 ont besoin d'un milieu adapté pour leur culture, aussi il convient de modifier la composition pour une meilleure compatibilité (Patel et al. 2006).

**Tableau 6.** Milieu mimant le fluide de l'intestin grêle à jeun (FaSSIF), postprandial (FeSSIF) et du côlon (ScoF)

Composition (mM)	FaSSIF	FeSSIF			ScoF
		duodénum	jéjunum	iléon	
Taurocholate de sodium	3	10	7.5	4.5	-
Lécithine	0.2	3	2	0.5	-
Acide maléique	19.12	28.6	44	58.09	-
Hydroxyde de sodium	34.8	52.5	65.3	72	157
Chlorure de sodium	68.62	145.2	122.8	51	-
Acide acétique	-	-	-	-	170
Monocholeate glycéryl	-	6.5	5	1	-
Oléate de sodium	-	40	30	0.8	-
<b>Propriétés</b>					
pH	6.5	6.5	5.8	5.4	5.8
Osmolarité (mOsm/kg)	180±10	400±10	390±10	240±10	295
Tampon (mmol/L/pH)	10	25	25	15	29.1

Pour les modèles statiques, de grands volumes de milieu sont nécessaires et l'agitation continue n'est pas représentative des mouvements péristaltiques de l'intestin. Les modèles mono-compartmentaux se retrouvent avec le produit initial et les produits de dégradation mélangés. L'ajout d'un système de dialyse permet de retirer progressivement ces produits de dégradation (Miller et al. 1981).

## 1.2. Les modèles dynamiques

Les modèles statiques sont particulièrement intéressants pour comprendre étape par étape les processus de dégradation du xénobiotique. Cependant pour obtenir une réponse plus complète, il est préférable de se tourner vers des systèmes dynamiques mono ou multi-compartmentaux pour simuler les événements physiologiques et physicochimiques complexes qui se produisent dans le tube digestif comme : la vidange gastrique, la fluctuation de pH ou le débit de sécrétion des enzymes ou du mucus (Mainville, Arcand, et Farnworth 2005).

Le modèle gastrique dynamique (DGM) est un modèle mono-compartmental qui est spécifique de l'estomac, il prend en compte l'acidification progressive par un ajout d'HCl et

l'évolution dans le temps du débit de pepsine (Hoebler et al. 2002). Séparé en deux parties par une valve, il mime la vidange gastrique. La première partie du compartiment fait office de système de broyage mécanique puisque des forces de cisaillement sont reproduites à l'aide d'un piston, dans une seringue qui pousse la solution vers la deuxième partie du compartiment, au travers d'une valve. Les plus petites molécules sont éliminées par la valve tandis que les plus grosses sont refluées vers la deuxième partie du compartiment. La seconde partie est le lieu du mélange entre les xénobiotiques et les sécrétions gastriques. Un circuit permet de contrôler l'ajout de HCl et de sécrétions gastriques. Le pH est contrôlé par une électrode à pH (Vardakou et al. 2011).

Le modèle de simulation gastrique humaine (HGS), est un modèle qui fait intervenir les mouvements péristaltiques grâce à une courroie qui fait tourner deux rouleaux positionnés de part et d'autre d'une chambre en latex contenant le mélange de sécrétion gastrique et de xénobiotiques. Dans ce modèle aussi, le débit de la pepsine est contrôlé (Kong et Singh 2010).

Un système plus complexe, contrôlé par un ordinateur, est capable de reproduire la température et les changements de pH dans deux compartiments séparément. Un premier compartiment mimant l'estomac met en mélange les xénobiotiques avec un flux de sécrétions gastriques contrôlé. Une pompe aspire à intervalle de temps donné le mélange pour l'envoyer vers un second compartiment en deux parties correspondant au duodénum proximal et au duodénum distal. Les paramètres de chaque chambre de ce deuxième compartiment peuvent être réglés individuellement (pH, température, ajout de pancréatine et de sels biliaires). Ce système est toujours en mouvement puisqu'une autre pompe aspire avec un débit ajustable le mélange de ce deuxième compartiment. Une dialyse peut également être ajoutée au produit final de digestion (Vatier, Célice-Pingaud, et Farinotti 1998).

Seul le modèle dynamique multi-compartimental TIM (TNO gastrointestinal Model) est considéré comme « complet », allant d'un compartiment oral avec une salive synthétique jusqu'à l'iléon avec un compartiment pour chaque portion gastrique et intestinale (Dickinson et al. 2012). Bien que très développé, ce modèle n'est pas adapté à un travail en routine et à une méthode standardisée pour l'étude des xénobiotiques.

A l'aide de ces modèles, des études ont permis de montrer que les protéines thérapeutiques sont sensibles aux conditions salivaire, gastrique et/ou intestinale. Aussi, un

ensemble d'outils d'ingénierie protéique ont été développés pour modifier les protéines thérapeutiques et améliorer leur capacité de résistance, clairance et affinité pour leur cible (Di 2015).

## 2. Les outils permettant l'administration orale des protéines thérapeutiques

### 2.1. Les approches facilitant l'administration orale d'un xénobiotique

Différentes stratégies ont été mises au point pour faciliter la perméabilité des peptides dans la muqueuse intestinale et leur résistance aux enzymes de digestion.

**Les agents facilitateurs de perméabilité\_** Ces agents agissent directement sur la voie transcellulaire. Ils peuvent chélater les ions qui sont indispensables au fonctionnement des co-transporteurs (Isenring et Forbush 1997). Ils peuvent également agir indirectement sur la voie paracellulaire en stoppant l'action des ions nécessaires au fonctionnement des protéines de jonction. Par exemple, l'E-cad peut être impactée lorsque le calcium est chélaté (van Roy et Berx 2008). Les agents stimulant le passage des peptides ne doivent pas endommager pour autant la barrière intestinale. Ils peuvent présenter une cytotoxicité locale transitoire de l'épithélium permettant alors le passage des peptides (Aguirre et al. 2016). Une étude sur une lignée Caco-2 a montré que les esters gras pouvaient améliorer le passage paracellulaire tandis que les tensioactifs cationiques avaient plutôt un impact sur la voie transcellulaire (Artursson et Magnusson 1990). Il n'existe à l'heure actuelle que quelques agents facilitateurs de perméabilité ayant réussi les tests de sécurité et d'efficacité. Nous pouvons citer le caprate de sodium (ou acide décanoïque) qui est utilisé comme additif alimentaire et qui peut agir dans les conditions du pH gastrique et intestinal (Twarog et al. 2019).

**Les agents facilitant le passage du mucus\_** Des études ont montré que l'ajout de polyéthylène glycol (PEG) dans la formulation du peptide permettait d'améliorer la pénétration dans le mucus intestinal (Shan et al. 2015). Des nanoparticules, constituées d'un revêtement hydrophile à base d'un copolymère pHPMA, contenant les molécules thérapeutiques augmentent elles aussi la vitesse de passage du mucus (Huanli Sun et al. 2017). Ces agents désignés de mucolytiques peuvent être des surfactants ou des chitosans (Ahonen, Hill, et Schoenfisch 2019).

**L'inhibition des enzymes\_** De nombreuses enzymes participent à la dégradation des peptides, empêchant ainsi leur passage à travers la barrière épithéliale. A l'aide d'une co-formulation

entre une protéine cargo et un inhibiteur d'enzymes tel que l'apoprotéine, la leupeptine ou le soja inhibiteur de trypsine, le peptide possède une protection locale au site d'absorption de la muqueuse intestinale (J. J. Liu et al. 2011). Une autre stratégie consiste à enrober le peptide d'une tablette insensible au pH acide, lui permettant de traverser le compartiment gastrique sans subir l'action de la pepsine. Lorsque le peptide entouré de la tablette arrive dans l'intestin elle est dissoute par l'augmentation du pH, libérant les peptides directement au niveau de la barrière intestinale (Binkley et al. 2012). Une étude chez les Beagles a montré que coadministrer de l'acide citrique avec la calcitonine de saumon par voie orale réduisait l'action de la trypsine et augmentait l'absorption de la calcitonine (Y. H. Lee et al. 1999)

[Les patchs intestinaux](#)\_ Ils jouent le rôle de réservoir de molécules et de protecteur vis-à-vis de la dégradation protéique. Les patchs mucoadhésifs facilitent le transport paracellulaire en perturbant les jonctions serrées intestinales. Par exemple un patch a été développé pour faire passer l'insuline dans la circulation systémique. L'avantage de cette méthode est qu'elle n'entraîne pas d'altération majeure de la muqueuse (Banerjee et al. 2019).

[L'encapsulation](#)\_ Ajouter une structure de protection autour des protéines peut permettre d'améliorer la solubilité, réduire la toxicité et protéger les polypeptides. Plusieurs types d'encapsulations existent, tenant compte des interactions spécifiques entre la protéine et le support (Kita et Dittrich 2011). L'administration ciblée des agents anticancéreux a progressé avec l'aide des nanoparticules. L'hydroxyapatite est particulièrement intéressante puisqu'elle est biocompatible et inerte dans les fluides corrosifs (Alobeedallah et al. 2011). Les liposomes sont utilisés comme vecteur de produits pharmaceutiques et nutritionnels car ils encapsulent aussi bien des composés hydrophiles que lipophiles (Nguyen et al. 2016).

[La modification des peptides](#)\_ Une structure cyclique limite l'accès des enzymes restrictives aux extrémités N et C terminales des protéines. La cyclosporine est un exemple de peptide cyclique ayant montré son efficacité à résister à la digestion enzymatique (Barone et al. 1996). Des séquences peptidiques dérivées de virus utilisé pour la translocation de membrane ont la capacité de traverser par endocytose les cellules grâce à leur interaction avec les glycosaminoglycanes des membranes (Rehmani et Dixon 2018). Différents outils permettent de modifier la séquence des peptides, notamment l'ingénierie protéique.

## 2.2. L'ingénierie protéique

Les scientifiques emploient deux concepts pour modifier les séquences polypeptidiques des protéines. Ils peuvent utiliser la diversité naturelle générée par les organismes ou réaliser une mutagenèse dirigée leur permettant alors de créer de nouvelles protéines.

### 2.2.1. Exploration de la diversité naturelle

L'objectif de cette méthode est de regarder toutes les protéines produites par un organisme et de sélectionner par criblage celles d'intérêts.

**Approche métagénomique**\_ Cette approche vise à étudier le contenu génétique d'un échantillon issu d'un environnement complexe trouvé dans la nature (par opposition à des échantillons cultivés en laboratoire) (Simon et Daniel 2011). Le principe est d'extraire de l'ADN d'un organisme pour en faire une banque de données puis d'appliquer des désoxyribonucléases (DNase) ou des enzymes de restriction pour fragmenter l'ADN (Handelsman 2004). Les fragments du génome sont intégrés dans un vecteur (plasmide chez les procaryotes, phage chez les eucaryotes). Ces vecteurs sont incorporés chez un hôte (une souche d'expression bactérienne ou des cellules de mammifère par exemple) (Simon et Daniel 2017). Certains organismes n'expriment pas les mêmes codons, le choix de l'hôte est important pour ne pas se retrouver avec une protéine mal repliée, tronquée ou non fonctionnelle. Par exemple, un hôte eucaryote est capable de réaliser les modifications post-traditionnelles que ne font pas les procaryotes (Fitchette et al. 2007). Les protéines traduites par l'hôte sont isolées puis criblées pour ne garder que celles qui ont l'activité recherchée. Les méthodes de criblage sont variées et nous pouvons citer les puces à ADN, les RT-PCR, le séquençage haut débit par exemple (Tyx et al. 2020).

Il est possible de s'affranchir du criblage en utilisant d'autres techniques. Par exemple avec les informations connues de la banque de données, nous savons quel gène code pour la protéine d'intérêt et, dans ce cas, il est possible de synthétiser directement le gène et de l'inclure dans le vecteur.

**Approche méta-transcriptomique**\_ Dans cette approche, les gènes matures sans introns sont préférés, c'est pourquoi les ARN sont extraits au lieu de l'ADN (Mukherjee et Reddy 2020). Cette méthode est cependant délicate car les ARN ont une faible durée de vie et sont très sensibles aux enzymes. A partir des ARN totaux extraits sont isolés les ARNm par des méthodes

de dégradation spécifique ou de co-immunoprécipitation des ARN ribosomiques. Une reverse transcription est effectuée pour obtenir des ADN complémentaires (ADNc). En fonction de la quantité de matériel, il est parfois nécessaire d'amplifier les ADNc avant de pouvoir les séquencer (Chamakura et al. 2020).

De nombreuses protéines sont produites par des organismes que nous ne savons pas cultiver et certaines fonctions enzymatiques sont difficiles à cribler, c'est pourquoi d'autres méthodes ont été utilisées pour modifier les protéines à notre convenance.

### 2.2.2. La mutagenèse dirigée

La modification à façon d'une séquence protéique doit tenir compte de la localisation des AA. Des régions définies comme le site actif, les positions flexibles, les bases structurales sont susceptibles d'atteindre l'intégrité structurale et fonctionnelle de la protéine.

**Evolution moléculaire dirigée**\_ Un gène sauvage codant pour une protéine peut être modifié par l'introduction de mutations spécifiques ou aléatoires. L'introduction de ces oligonucléotides peut se faire par hybridation du gène d'intérêt dans le génome ou par l'utilisation de nucléases à doigt de zinc. La polymérase en charge de l'ajout des AA va commettre plus d'erreurs en présence de manganèse par exemple et donc former de nouvelles protéines qui n'étaient pas existantes à l'origine (McCullum et al. 2010). Il existe naturellement un polymorphisme génétique qui donne une variété de séquences, et des mutations silencieuses de certains nucléotides ne modifient pas le génotype puisqu'il existe plusieurs codons pour un même acide aminé. La dégénérescence du code génétique est la redondance de codon pour former un même acide aminé (Walti 1986). Elle résulte du fait qu'il existe plus de codons que d'AA encodables. Cette redondance empêche que certaines mutations silencieuses n'affectent la protéine, néanmoins cette mutation silencieuse peut donner une nouvelle fonction ou améliorer une fonction existante. Il est important de veiller à ne pas introduire de codon-stop.

**Evolution par permutation circulaire**\_ L'ajout d'un linker sur un gène permet de le circulariser, ce qui favorise la formation de nouvelles extrémités N- et C-terminales lors des coupures aléatoires par les enzymes de restrictions (Pierre et al. 2015). Ces nouvelles extrémités conduisent à une diversification des applications pour les nouvelles protéines.

La mutagenèse dirigée impose de nombreuses optimisations du génome comme : l'amélioration du gène d'intérêt pour qu'il soit surexprimé, l'amélioration de la stabilité et de la traduction de l'ARNm, l'adaptation de la force du promoteur pour éviter la précipitation des protéines ou l'amélioration de la séquence de fixation au ribosome pour que la synthèse puisse se dérouler correctement. Il est possible également d'optimiser les codons d'usage. La fréquence des codons diffère d'un organisme à un autre ; soit il faut optimiser la souche codante pour les codons manquants soit il faut synthétiser des codons optimisés. Enfin, il est nécessaire de trouver un moyen d'éliminer les gènes codants pour des enzymes qui dégradent le produit ou le substrat de réaction.

### 2.2.3. L'ingénierie rationnelle des protéines

L'ingénierie rationnelle a pour objectif la connaissance fine de la relation structure-fonction. Elle se met en place après un travail de prédiction de la modification et ainsi permet de limiter l'exploration à un faible nombre de possibilités.

Cette approche est, par exemple, à l'origine de l'introduction d'une étiquette peptidique pour faciliter l'utilisation de la protéine lors des purifications, du suivi *in vivo*, du dosage, etc (Daggett, Layer, et Cropp 2009). Les protéines à multi domaines ont les séquences des domaines identiques mis à part celles qui peuvent reconnaître des régions spécifiques de l'ADN. Les intéines réalisent un épissage naturel des protéines sous l'assistance de molécules catalytiques. On peut aussi utiliser des doigts de zinc fusionnés à une nucléase spécifique pour faire les knock-out (Pratt et al. 2012).

Bien que l'ingénierie rationnelle soit plus rapide et ne nécessite pas de criblage à haut débit, cette méthode est soumise à la connaissance de la structure primaire (enchaînement en acide aminé), secondaire (sous unité) et tertiaire de la protéine (repliement) (Park, Lui, et Cochran 2017). Moins de 15 % des séquences protéiques sont connus et la méthode de cristallographie qui permet d'obtenir ces informations n'est pas accessible pour la majorité des protéines. Lorsqu'un ajout ou une délétion est effectué, nous n'avons pas de recul sur le résultat de la mutation du point de vue repliement, stabilité protéique, dynamique. Des outils de modélisation moléculaire ont été développés pour éviter les non-conformités de prédiction et faire un premier screening des mutations possibles.

Les protéines enzymatiques possèdent un site actif avec une fonction catalytique, qui est le lieu de l'interaction avec d'autres protéines ou cibles. Alors que les AA impliqués dans ce site catalytique peuvent plus facilement être identifiés, certains AA éloignés de ce site jouent tout de même un rôle clé qu'il est plus difficile, voire impossible d'identifier par modélisation.

L'obtention de mutants améliorés est fastidieuse. Elle nécessite de nombreuses étapes entre analyse de la séquence et de la structure, identification des positions cibles, modélisation moléculaire, mutagenèse dirigée, production des mutants, purification, caractérisation fonctionnelle et séquençage (Figure 31).

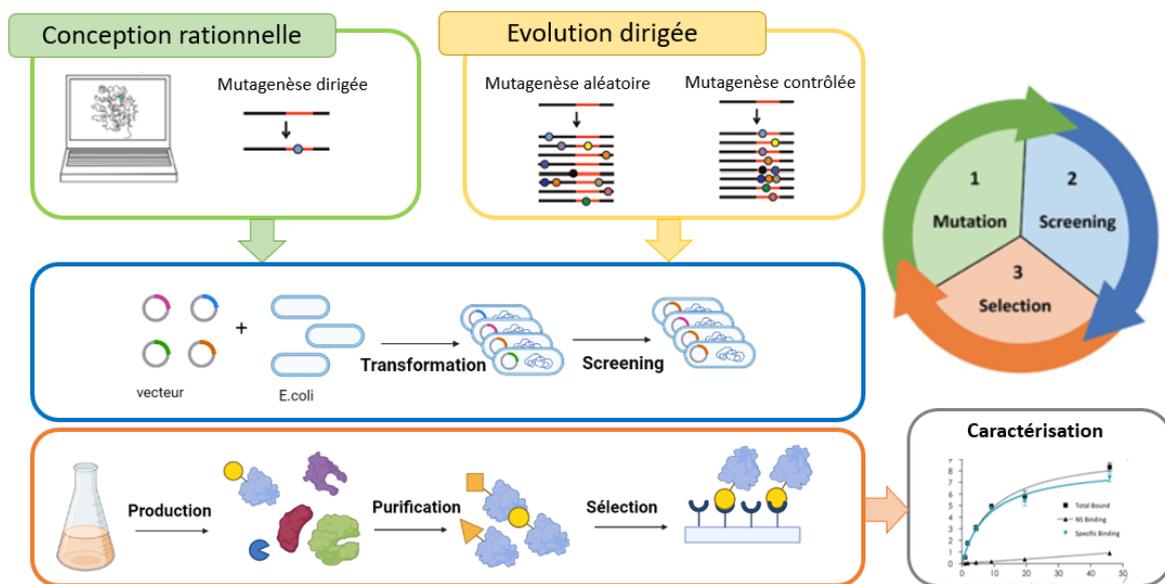


Figure 31. Les différentes approches d'ingénierie protéique de la conception à la caractérisation de la protéine d'intérêt

L'ingénierie protéique est donc un outil très appréciable puisqu'elle permet : d'augmenter la stabilité d'une protéine face à la température, au pH ou aux solvants ; de créer de nouveaux sites de reconnaissance pour de nouveaux substrats ; de modifier la spécificité des enzymes, et notamment leur régio et stéréospécificité, pour qu'elles puissent transformer des substrats non naturels comme les xénobiotiques ; et diminuer la sensibilité des protéines à l'action d'inhibiteurs.

### 3. Les modèles d'étude de la barrière intestinale

#### 3.1. Etudes réglementaires

Différents facteurs peuvent altérer la barrière intestinale et engendrer une hyperperméabilité qui laisse passer des pathogènes ou composés toxiques à l'origine de diverses maladies. Les xénobiotiques de types polluants sont soumis à une autorisation de mise sur le marché, mais aucune disposition n'est prise pour évaluer leur effet chez l'Homme à ce stade, contrairement aux agents thérapeutiques. Une fois déployée sur le terrain, la pharmacovigilance prend le relais et les études de toxicité sont mises en place pour les xénobiotiques auxquels nous sommes le plus exposés. Les xénobiotiques sont susceptibles d'interagir sur de nombreux mécanismes physiologiques. Nous ne connaissons pas l'ensemble des voies impliquées, c'est pourquoi la pharmacopée européenne a déterminé une liste de voies pertinentes pour évaluer la toxicité des nouveaux agents.

Les études de la toxicité aiguë et chronique sont réalisées chez l'animal. Le but est d'administrer une unique dose massive du composé pour déterminer la concentration où 50 % de la population testée décède. Cette valeur de toxicité appelée Concentration Létale 50 (CL50) est exprimée en mg de substance testée par kg d'animal ou en mg de substance par litre d'air (Ekwall 1999). Toutes les voies d'intoxications peuvent être étudiées (inhalation, ingestion, voie cutanée). Depuis 2002, les réglementations sur l'utilisation des animaux de laboratoire ont évolué et la détermination directe du CL50 est interdite en Europe. Pour les nouvelles molécules, une autorisation particulière est accordée, avec un très faible nombre d'animaux autorisé (entre 5 et 9), dans le cas où aucune information bibliographique sur la toxicité n'est à la disposition (Laddha, Murugesan, et Kulkarni 2020).

La toxicité chronique est le résultat d'une exposition répétée d'un produit dont les effets néfastes ne se feront sentir que quelques mois à quelques dizaines d'années plus tard. L'objectif est donc de déterminer quelle est la dose quotidienne d'exposition en dessous de laquelle n'apparaissent pas d'effets sur la santé. Appelée la Dose Sans Effet (DSE, ou en anglais NOAEL, Non Observable Adverse Effect Level), elle permet de déterminer la Dose Journalière Admissible (DJA) pour l'Homme en termes de résidus (exprimé en mg/kg) (Bokkers et Slob 2007). Des facteurs de sécurité sont appliqués pour tenir compte de la variabilité inter-espèce due au passage de l'animal à l'Homme, et de la différence de métabolisme d'un individu à un

autre (DJA = DES/100) (Dorato et Engelhardt 2005). Par exemple si la DJA est de 0,2 mg/kg, pour un individu de 60kg, il ne faut pas être exposé à plus de 12 mg de composé par jour. Les études de toxicité chronique ne sont faisables que pour une seule substance active, les effets synergiques entre les molécules sont donc ignorés.

Bien que la CL50 soit interdite, de nombreux autres tests sont réalisés chez l'animal, en voici quelques exemples. La toxicité sur le développement embryonnaire prévoit d'être testée sur 2 espèces différentes (rongeur et lagomorphe) pour mesurer le potentiel tératogène du xénobiotique et les altérations au cours de la croissance embryonnaire (développement neurologique, développement des membres) (Rosa, Wilk, et Kelsey 1986; Keseru et al. 2004). La toxicité sur la reproduction impose d'être étudiée pour vérifier les performances des organes de la reproduction (fonction des gonades, cycle, accouplement, gestation, parturition et lactation) (Goericke-Pesch 2017) (De Oliveira et al. 2020). La phototoxicité évalue sur la peau d'animaux le potentiel corrosif du xénobiotique par excitation du composé après une exposition à la lumière (Youn et al. 2020).

La prise en compte de la sensibilité et du bien-être animal conduit à remettre en cause son utilisation à des fins scientifiques. Les moyens d'identification de l'altération de la barrière intestinale et de la toxicité ont subi une grande évolution au cours du temps avec l'avènement du principe des 3R (Raffiner, Réduire et Remplacer) en expérimentation animale (Díaz et al. 2020). Face à ce nouveau défi, des procédés simples, reproductibles, non invasifs et évolués ont été développés.

Le Centre européen pour la validation des méthodes alternatives propose d'ailleurs une liste de modèles cellulaires *in vitro* validés pour prédire la sécurité et la toxicité des ingrédients cosmétiques avec notamment des modèles de peau artificielle (Ponec 2002). L'utilisation des bactéries est particulièrement développée pour les études de mutation génétique humaine dans les tests de génotoxicité. La génotoxicité est un paramètre important lors des études de toxicité. Trois tests sont nécessaires avant de pouvoir conclure sur un éventuel effet : le test d'Ames qui est un test bactérien de mutation génique *in vitro*, le test de mutation génique *in vitro* au locus HPRT sur cellules de mammifères et le test de micronoyaux *in vivo* sur les érythrocytes de mammifères (Zeiger 2019).

Ces essais *in vitro* bactériens sont plus rapides à effectuer, peu coûteux et faciles à mettre en place au sein d'un laboratoire. Ces essais de mutation peuvent ne pas convenir pour les xénobiotiques exerçant une activité bactéricide. Dans ce cas, l'utilisation d'autres animaux comme les drosophiles ou les Zebra Fish est encouragée (Peraza-Vega et al. 2017 ; Wahyuni et al. 2021).

### **3.2. Etudes conventionnelles**

#### *3.2.1. Les études sur l'Homme*

Pour étudier la perméabilité membranaire intestinale des personnes atteintes d'inflammation chronique de l'intestin, des tests de perméabilité chez l'Homme existent. Ils sont basés sur le fait que certaines molécules ne sont pas métabolisées en totalité ce qui permet de les retrouver dans les urines. Le lactinol (grosse molécule) et le mannitol (petite molécule) sont deux composés de taille différente, donc elles vont utiliser deux voies distinctes pour traverser la barrière intestinale : l'une passe entre les cellules de l'intestin et l'autre traverse les cellules pour être absorbée (Genser et al. 2018). Dans le cas d'une barrière saine, il ne passe que 2 molécules de lactinol pour 100 molécules de mannitol. Une quantité importante de peptides dans les urines indiquera l'existence d'une mauvaise digestion des aliments, mais aussi d'une forte perméabilité intestinale. La présence de lésions épithéliales ou d'un taux d'apoptose accru fournit des voies alternatives pour la perméation du lactinol.

De nouvelles sondes à base de différents sucres tels que le saccharose, lactulose, l-rhamnose, érythritol et sucralose ont permis de différencier la perméabilité des segments intestinaux. Le disaccharide saccharose est utilisé comme marqueur de la perméabilité gastroduodénale, tandis que le rapport entre l'érythritol et le sucralose est utilisé comme évaluation de la perméabilité colique (van Wijck et al. 2013). Après avoir bu une solution contenant les sondes oligosaccharidiques, un prélèvement d'urine est effectué puis analysé par chromatographie liquide à haute performance.

Un autre moyen de comprendre l'état de la perméabilité intestinale est de regarder des biomarqueurs fiables dans le sang. La zonuline (47 kDa), un analogue humain endogène de l'entérotoxine bactérienne zonula occludens toxine, désassemble les complexes protéiques de la jonction serrée (Fasano et al. 2000). Les protéines liant les acides gras sont des protéines

cytosoliques d'environ 15kDa qui fixent et transportent les acides gras. Chaque segment possède une protéine spécifique (L-FABP, I-FABP, IL-FABP,...) (Gajda et Storch 2015). Les FABP vont être libérées dans le plasma sanguin suite à des ischémies de la barrière, des altérations ou des maladies de l'intestin grêle, les rendant facilement détectables (Kanda et al. 1992). La citrulline, un acide aminé non protéique, utilise la glutamine comme précurseur pour être produit par les entérocytes. Elle représente un biomarqueur de la réduction de la masse des entérocytes et donc est un témoin de l'augmentation de la perméabilité intestinale. Il a été constaté une diminution de la citrulline dans le sang des patients ayant eu une transplantation de cellules souches hématopoïétiques (Crenn, Messing, et Cynober 2008). D'autres marqueurs ont été identifiés comme le lipopolysaccharide (LPS), une endotoxine, présente à la surface des bactéries ; le GLP-2 un produit de clivage du glucagon spécifique de l'intestin ; la  $\alpha$ -1-antitrypsine, un inhibiteur de la sérine protéase, retrouvé dans les fèces et corrélé à la maladie de Crohn (Karch, Ewe, et Bodenstern 1983).

L'étude des effets de nouvelles molécules ou des xénobiotiques sur la barrière intestinale et l'exploration des mécanismes affectés ne peut être réalisée directement chez l'Homme. Aussi un effort a été fait pour développer des moyens reproductibles et proches de la réalité pour évaluer les propriétés de perméabilité en laboratoire (gradient de concentration, intégrité de la surface de l'épithélium, durée de la perméation, ...) (Arrieta, Bistritz, et Meddings 2006).

### 3.2.2. *Les modèles in vivo*

Les modèles animaux et plus particulièrement les mammifères sont les modèles vivants présentant des similarités du point de vue anatomique, physiologique, histologique et fonctionnel avec l'Homme. Dans ce sens, les résultats obtenus avec l'utilisation des mammifères restent le plus souvent la référence pour le développement de futurs modèles de toxicité et de perméabilité intestinale. De plus, les animaux expriment de nombreuses maladies communes avec l'Homme, ce qui facilite les tests d'efficacité d'agents thérapeutiques ou les études de compréhension des mécanismes de la pathologie. Par exemple, dans des pathologies inflammatoires chroniques de l'intestin, le modèle porcin est particulièrement adapté, car les lésions inflammatoires intestinales sont comparables à celles observées chez les patients atteints de MICI (Yandza et al. 2012). De plus, le modèle porcin fournit une réponse immunitaire analogue à celle de l'Homme (Oswald 2006).

Les modèles rongeurs et lagomorphes sont particulièrement développés puisqu'ils sont faciles à élever (grand nombre sur une superficie restreinte) et il est possible de modifier spécifiquement leurs gènes pour en comprendre leur fonction (Giocanti-Auregan et al. 2013). Ce sont des modèles utiles pour étudier les facteurs d'inflammation chronique de l'intestin, les désordres métaboliques et la modulation du microbiote intestinal (Burrello et al. 2019). Le gavage oral avec une dose précise de composé marqué permet de suivre la distribution le long du tractus digestif. Lorsque le 4 kDa fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran est ingéré par le rongeur, des échantillons de sérum sont prélevés pour mesurer la perméabilité épithéliale du FITC-dextran (B.-R. Li et al. 2018).

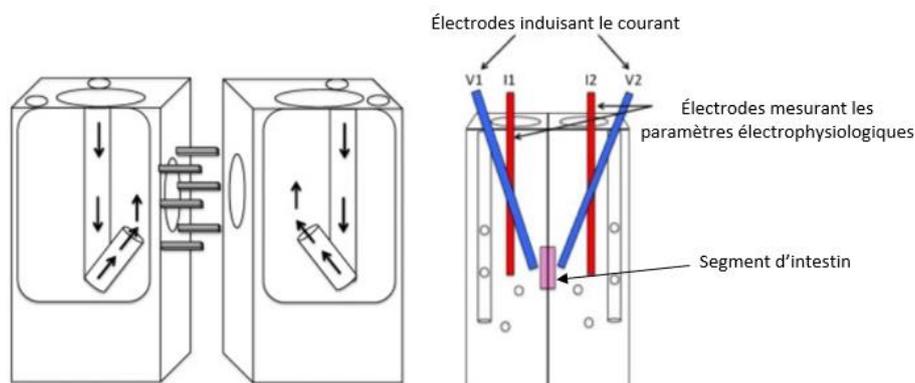
Les chercheurs peuvent également opter pour des espèces moins sensibles à la douleur comme les poissons ou les invertébrés. C'est le cas notamment du modèle de poisson-zèbre pour la toxicité intestinale induite par les médicaments (Ryu et al. 2018). Des tests de toxicité aiguë sont parfois réalisés chez les vers à soie (Usui et al. 2016) et les drosophiles (Peraza-Vega et al. 2017).

### 3.2.3. *Les modèles ex vivo*

Le principe des modèles *ex vivo* consiste à perfuser directement un organe ou un morceau d'organe en dehors de l'organisme dont il est issu. La perméation en chambre de Ussing représente le système le plus adapté pour ce modèle (Ussing et Zerahn 1999).

Un segment d'intestin est monté entre deux demi-chambres remplies d'un tampon oxygéné en continu. Une paire d'électrodes génère le courant tandis qu'une autre paire est présente pour suivre les paramètres électrophysiologiques tels que la résistance électrique transépithéliale (TEER) (Thomson et al. 2019). Après l'ajout de marqueurs dans la chambre muqueuse, il est possible de prélever à intervalle de temps précis des échantillons dans la chambre séreuse pour mesurer leur passage au travers du segment intestinal (Figure 32).

Avec la chambre d'Ussing, tous les tissus épithéliaux ou monocouches de cellules peuvent être perfusés en continu. La miniaturisation du procédé permet de réduire les volumes de xénobiotiques à tester et permet aussi de réutiliser la même biopsie pour plusieurs séries d'expériences. Le screening de molécules peut être envisagé, Schimpel et al. ont publié un article où ils évaluaient le transport de plusieurs nanoparticules à l'aide de segments intestinaux porcins en chambre de Ussing (Schimpel et al. 2014).



**Figure 32.** Organisation d'une chambre d'Ussing. *Figure de Thomson et al. 2019.*

Le tissu est fixé par des broches métalliques entre les deux moitiés de chambre. Deux paires d'électrodes Ag/AgCl génèrent le courant et mesurent les paramètres électrophysiologiques. La direction du flux de gaz vers le tampon est indiquée par des flèches.

Des études ont montré la robustesse et reproductibilité des résultats. Des biopsies de 159 patients ont été utilisées pour tester 28 médicaments. Quatre régions intestinales, duodénum, jéjunum, iléon et côlon ont permis de montrer la perméabilité spécifique des médicaments à chaque segment de l'intestin. Le suivi de la perméabilité intestinale a été étudié en utilisant la testostérone comme substrats de sonde (Sjöberg et al. 2013).

### 3.3. Les modèles alternatifs *in vitro*

L'évaluation de la perméabilité intestinale est importante, car la muqueuse du tractus gastro-intestinal est la première barrière pour les xénobiotiques oraux. Jusqu'à présent, les modèles animaux (rongeurs) ont été recommandés par la pharmacopée, mais depuis les années 2000, les modèles *in vitro* se sont imposés comme une alternative suffisante pour mimer la barrière intestinale en limitant les coûts et diminuant l'utilisation des animaux. Ces modèles ont d'ailleurs permis d'acquérir les connaissances de base sur la physiologie de l'appareil digestif.

La méthode *in vitro* la plus communément répandue et validée pour déterminer la perméabilité membranaire est la mesure du flux de molécule à travers une monocouche de cellules d'adénocarcinome de côlon humain Caco-2 (Boim et al. 2019). Il s'agit d'une lignée cellulaire qui présente les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des cellules intestinales. Les cellules Caco-2 forment des jonctions serrées et développent des

microvillosités (Cheng, Li, et Uss 2008). Elles expriment les enzymes de la bordure en brosse, les facteurs de croissance, les récepteurs et les principales enzymes métabolisant les médicaments, à l'exception de CYP3A4 (Borlak et Zwadlo 2003). En outre, les cellules Caco-2 possèdent une gamme de transporteurs trouvés dans les cellules intestinales absorbantes, comme la P-glycoprotéine, des protéines associées à la multirésistance aux médicaments, des protéines de transporteur d'anions organiques, etc. (Maubon et al. 2007). Il est également admis que la majorité des composés avec une bonne perméabilité sur Caco-2 ont une bonne absorption intestinale chez l'Homme.

C'est pourquoi, les études de perméabilité *in vitro* à travers la monocouche de cellules Caco-2 sont couramment utilisées dans l'industrie et sont également acceptées comme substitut aux mesures de perméabilité intestinale humaine par « l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux » (Food and Drug Administration - FDA) pour soutenir de nouvelles applications de médicaments. Néanmoins, certaines variations de l'expression des transporteurs peuvent se produire dans les cellules Caco-2 en fonction de l'origine des cellules, ce qui souligne l'intérêt de caractériser soigneusement les niveaux de transporteurs dans tous les clones de cellules Caco-2 avant de les utiliser pour des essais de transport de médicaments (Maubon et al. 2007).

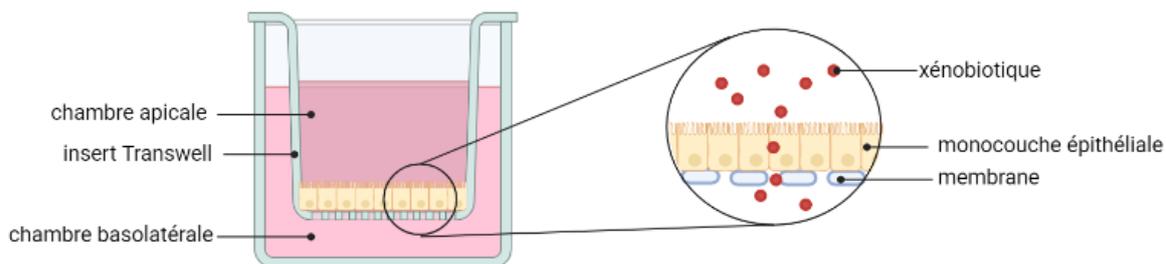
Le choix de la lignée cellulaire épithéliale dépend fortement des paramètres étudiés. La présence de mucus peut jouer un rôle important dans l'adhésion et l'invasion des agents pathogènes. La lignée épithéliale HT-29 provient également d'un adénocarcinome de côlon. Elle est plus pertinente sur le plan physiologique avec la formation de la couche de mucus, et donc plus adaptée aux études des interactions cellules-pathogènes (Gagnon et al. 2013). La lignée HT-29 est considérée comme une lignée de cellules intestinales pluripotentes, car la modification du milieu de culture peut conduire à différentes voies de différenciation entérocytaire. La différenciation n'est pas spontanée, elle dépend de l'apport en nutriments. Par exemple, l'expression des hydrolases au niveau de la bordure en brosse est sensible à la présence de glucose. Lorsque les HT-29 sont cultivés avec du glucose, elles restent indifférenciées (Ponce de León-Rodríguez, Guyot, et Laurent-Babot 2019). De plus, les HT-29 mettent plus de temps pour se différencier en entérocytes avec une bordure en brosse que les Caco-2. Des clones de HT-29 ont été réalisés pour augmenter la production de mucines. C'est le cas de HT29-MTX qui, en présence de méthotrexate, produisent des cellules

caliciformes sécrétrices de mucus adhérent (Behrens et al. 2001). D'autres lignées sécrétrices de mucus ont été développées comme LS174T ou LS180 (Tom et al. 1976).

La réponse inflammatoire déclenchée par l'activité toxique des xénobiotiques nécessite des lignées épithéliales productrices de cytokines et d'hormones. C'est le cas des cellules épithéliales T84 qui ont la capacité de sécréter des cytokines pro-inflammatoires en présence d'*E.coli* (Braga et al. 2018). Elles se caractérisent par une différenciation en cellules ressemblant à des cryptes après induction par des facteurs de croissance humains recombinants (TGF $\beta$ 1 par exemple) ou d'autres facteurs solubles provenant de cellules mésenchymateuses (Devriese et al. 2017).

La culture en 2 dimensions s'est progressivement complexifiée au cours du temps pour se rapprocher de la réalité. Afin d'établir des modèles *in vitro* toujours simples à mettre en œuvre, mais un peu plus réalistes, plusieurs modèles de co-culture ou de triple-culture plus représentatifs de l'intestin grêle, ont été développés au fil des années. L'association de deux types de cellules épithéliales comme Caco-2 et HT-29-MTX permet de développer une monocouche épithéliale et une couche continue de mucus à sa surface. Cependant, ce modèle ne rend pas possible la formation de cryptes et villosités en raison de la monocouche. Un modèle de co-culture ressemblant à l'état sain a été créé avec des cellules Caco-2 et THP-1 différenciées. Ce type de modèle permet également d'étudier les effets des xénobiotiques sur une barrière enflammée suite à l'induction d'un état inflammatoire avec LPS et l'IFN- $\gamma$  (Kämpfer et al. 2017). Des modèles de triple-culture ont également été développés. Le modèle le plus répandu dans l'étude de l'absorption des xénobiotiques comprend les cellules Caco-2, HT29 et des lymphocytes B de Raji. Ce modèle est particulièrement utile pour acquérir le phénotype des cellules M. (Lozoya-Agullo et al. 2017).

Les différents types de cellules utilisés dans les tests de perméabilité, qu'ils soient de simples monocultures ou des systèmes plus évolués de co-culture, sont cultivés en monocouche sur un filtre qui sépare deux chambres : apicale et basolatérale. Cette structure facilite la polarisation des cellules et mime le mouvement des xénobiotiques entre la lumière intestinale (côté apical) et le compartiment sanguin après traversée des cellules épithéliales (côté basolatéral) (Figure 33). Ce système est nommé Transwell.



**Figure 33.** Représentation d'une monocouche cellulaire sur la technologie Transwell

Ce modèle Transwell a pour avantage d'acquies des propriétés de barrière notamment la polarité, les jonctions serrées, que les cellules n'ont pas en culture 2D sur des boîtes de Pétri. L'évaluation du transport d'un xénobiotique se réalise en l'ajoutant du côté apical, on suit alors le paramètre d'absorption en prélevant le milieu basolatéral. Il est également possible de regarder les effets sur la sécrétion de facteurs solubles, cytokines, et marqueurs inflammatoires en ajoutant alors le xénobiotique en basolatéral. L'utilisation du taurocholate de sodium en apical et d'albumine de sérum bovin en basolatéral permet d'augmenter la perméabilité de médicaments peu solubles dans l'eau (Kataoka et al. 2003). Un calcul de la perméabilité apparente représentant le taux d'accumulation du xénobiotique dans la chambre prélevée permet de comparer les profils des xénobiotiques entre plusieurs expériences. Ce paramètre tient compte de la surface du filtre et du volume de chaque chambre.

Un modèle de muqueuse intestinale a été développé employant une co-culture Caco-2/HT29-MTX adhéree sur un filtre Transwell avec un gel de collagène et des cellules stromales (fibroblastes) pour étudier l'absorption des xénobiotiques (N. Li et al. 2013). Ces modèles permettent d'évaluer non seulement les processus d'absorption des xénobiotiques, mais aussi de déterminer par quelle voie ils traversent en utilisant des composés comme la Lucifer Yellow (LY), l'inuline, le polyéthylène glycol, le dextran couplé à un fluorochrome comme le FITC, la horse radish peroxydase (HRP) ou encore l'acide sulfonique (Hidalgo, Raub, et Borchardt 1989). Par exemple la LY, sonde insoluble dans l'eau, ne traverse pas la barrière lorsqu'elle n'est pas altérée. Les composés de faibles poids moléculaires comme le FITC-dextran 4kDa empruntent la voie transépithéliale tandis que l'acide sulfonique (400 Da) et la HRP sont des marqueurs des flux paracellulaires. Il est à noter que la voie paracellulaire passive dans les

cellules Caco-2 est généralement inférieure à celle observée *in vivo* dans l'intestin humain (Schoultz et Keita 2020) .

L'intégrité des monocouches de cellules est vérifiée à l'aide du TEER. La perméabilité de la monocouche est liée à la formation des protéines de jonction qui assurent la cohésion cellulaire. La valeur de TEER reflète donc les structures et les propriétés physiques des cellules épithéliales cultivées sur filtre, lorsque la résistance diminue, alors une altération de la barrière a eu lieu (S. Chen, Einspanier, et Schoen 2015). Pour une différenciation cellulaire complète, la culture nécessite 3 semaines, ce qui représente un modèle long à mettre en place en vue du screening de molécule. C'est pourquoi, des cultures plus courtes d'environ 14 jours sont souvent réalisées, mais il faut garder à l'esprit que l'expression des protéines de métabolisation et de transport sera variable.

Des lignées cellulaires animales sont aussi utilisées pour les études de la perméabilité intestinale. La lignée cEIC provenant de cellules intestinales canines est intéressante pour étudier les effets des ingrédients alimentaires sur la fonction et la santé intestinales (Farquhar et al. 2018).

Les incohérences des résultats d'absorption observées entre les modèles de lignées cellulaires et les études *in vivo* ont conduit à l'utilisation de cellules primaires. Les cellules épithéliales intestinales humaines (HIEC) différenciées à partir de cellules souches intestinales sont un nouveau système d'évaluation de la perméabilité (Takenaka et al. 2016). Les HIEC servent également de modèles d'infection afin de mieux comprendre les interactions hôte-parasite (Castellanos-Gonzalez et al. 2013). La mise en culture des HIEC avec des macrophages, monocytes ou des médiateurs de l'immunité a montré qu'ils contribuaient à la perturbation de la barrière épithéliale par la dérégulation des protéines de la jonction serrée. La contribution des macrophages a par ailleurs induit une apoptose des cellules entraînant une inflammation intestinale importante (Lissner et al. 2015).

A la différence des lignées cellulaires immortalisées qui conservent leurs caractéristiques morphologiques et fonctionnelles après chaque division cellulaire, les cellules primaires sont moins homogènes et moins stables dans le temps. Les dérives doivent donc être contrôlées. De plus, la variabilité des réponses données par la culture des cellules primaires est à l'origine de problèmes de reproductibilité de résultats entre laboratoires (Kämpfer et al. 2017).

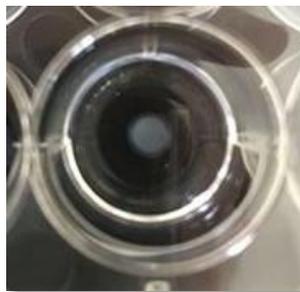
Pour pallier au manque de reproductibilité à l'échelle internationale, des systèmes automatisés sont apparus comme moyen de standardisation. La bio-impression, par exemple, offre des possibilités pour l'impression de cellules épithéliales intestinales primaires humaines et de myofibroblastes sur un filtre Transwell (Madden et al. 2018). Les modèles alternatifs se tournent donc vers des structures en 3 dimensions.

### 3.4. Les modèles alternatifs en 3D

#### 3.4.1. Les sphéroïdes

Les cocultures cellulaires en 2D même cultivées sur des filtres ne reproduisent pas l'architecture de l'épithélium multicellulaire et ne tiennent pas compte du microenvironnement qui l'entoure. C'est pourquoi le développement de modèle 3D avec l'ajout de matrice extracellulaire reflète mieux la complexité existante *in vivo*.

Des structures qui font office d'échafaudages vont permettre aux cellules de s'organiser dans l'espace et ainsi favoriser la formation de villosités et augmenter la perméabilité. Les types d'échafaudages sont variés, ils peuvent être de type nanofibres ou de type hydrogels (Figure 34).



**Figure 34.** Photo d'un sphéroïde réalisé au laboratoire.

Sphéroïde composé de cellules primaires dans un échafaudage d'alginate. Le sphéroïde est en suspension dans un milieu de chlorure de calcium qui permet de rigidifier la structure et de maintenir les cellules en son sein.

Des cellules ont été cultivées dans et sur un hydrogel d'alginate. Lorsqu'elles sont emprisonnées dans l'hydrogel les cellules s'organisent en multicouches, pour former des sphéroïdes. Tandis que les cellules cultivées sur des surfaces d'hydrogels ont plutôt formé des structures de type villosité. Sur le principe d'un modèle 3D intégrant les cellules dans l'hydrogel, une étude a montré que le modèle inflammatoire utilisant la lignée cellulaire

intestinale Caco-2 et les cellules immunitaires PBMC permettait de tester diverses formulations d'un médicament anti-inflammatoire et de distinguer l'efficacité thérapeutique selon la formulation (Leonard et al. 2012). Les sphéroïdes représentent un excellent moyen de mimer des tumeurs colorectales ou gastriques pour étudier les effets toxiques ou inducteurs de prolifération des xénobiotiques ou bien l'efficacité de ciblage d'agents thérapeutiques (Courau et al. 2019).

### 3.4.2. Les organoïdes

Dans l'objectif d'obtenir un modèle regroupant tous les types de cellules de l'intestin et qui conserve les propriétés physiologiques du tissu intestinal, l'accent a été mis sur le développement d'organoïdes. Ce modèle cellulaire est dérivé de cellules souches capables non seulement de se différencier, mais également de s'autorenouveler, donnant un modèle plus autonome. Trois sources de cellules permettent de générer des organoïdes : les cellules épithéliales intestinales obtenues par reprogrammation directe de fibroblastes ; les cellules souches pluripotentes ou embryonnaires qui peuvent donner des organoïdes épithéliaux et non épithéliaux (stromaux et mésenchymaux) ; ou les cellules souches intestinales qui se différencient pour donner des entérocytes, des cellules caliciformes, des cellules entéro-endocrines, des cellules de Paneth, des cellules M et des cellules de tuft (Schutgens et Clevers 2020).

L'organoïde, lorsqu'il est injecté sous la peau d'un animal, est capable de reconstituer localement un épithélium intestinal. Les expériences de transplantations démontrent l'intérêt de ces modèles pour la médecine régénérative (Nakamura 2019).

De façon générale, les systèmes de culture des organoïdes reposent sur l'immersion des cellules. Comme pour les sphéroïdes, les organoïdes se développent dans un gel ou une matrice extracellulaire (laminin-rich matrigel), immergés dans un milieu de culture (Sato et al. 2009). Ces systèmes favorisent l'expansion de l'épithélium pendant 60 jours, ce qui permet à la fois une prolifération et une différenciation multilinéaire, et à la fois le développement d'un microenvironnement approprié (X. Li, Ootani, et Kuo 2016). D'autres méthodes comme la différenciation des cellules souches pluripotentes (iPCS) ou embryonnaires (ECS) sont utilisées pour la modélisation de l'intestin, du côlon, de l'estomac ou encore du foie (Review of

*Modeling Development and Disease with Organoids*, par Hans Clevers 2016). Ces modèles permettent d'étudier les pathologies inflammatoires ou cancéreuses (Bartfeld et al. 2015 ; X. Li et al. 2014).

Pour les études de perméabilité membranaire, les IEC ou les cellules reprogrammées peuvent être cultivées en monocouches dans des boîtes de culture ou dans des systèmes Transwell en utilisant des cellules cultivées en organoïdes épithéliaux ou en épithélium intestinal isolé (Figure 35). Manipuler les organoïdes sur un système Transwell permet de former des monocouches plus complexes.

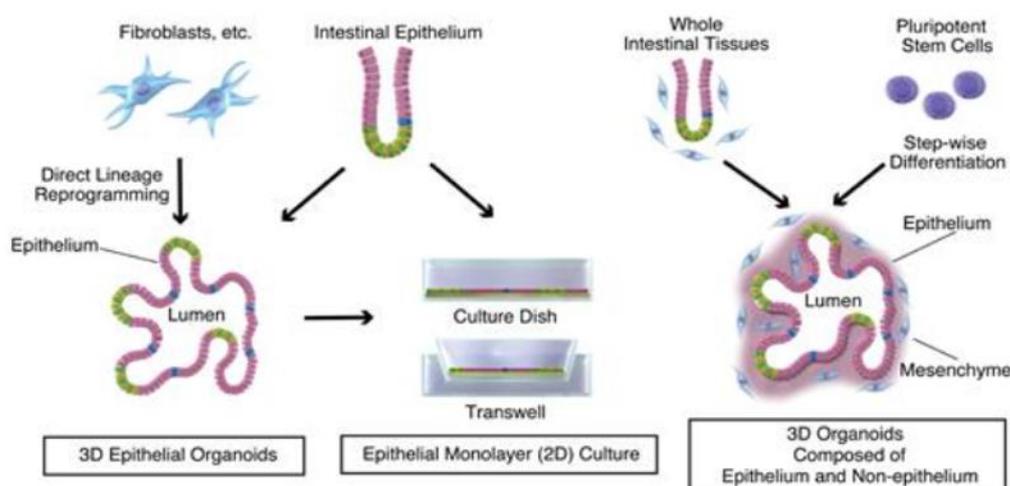


Figure 35. Les différentes formes d'organoïdes intestinaux pour modéliser les fonctions de la barrière intestinale. Figure de Nakamura 2019.

Puisque les organoïdes peuvent modéliser des pathologies humaines, il devient possible d'étudier les mécanismes de la pathologie. Il est même envisageable de réaliser les tests préliminaires de screening des médicaments sur ces modèles ou de réaliser de la médecine personnalisée (Rossi, Manfrin, et Lutolf 2018). Des modèles toujours plus complexes se développent continuellement avec notamment un modèle de co-culture macrophage-entéroïde humain primaire pour étudier la physiologie de la muqueuse intestinale et les interactions hôte-pathogène (Noel et al. 2017).

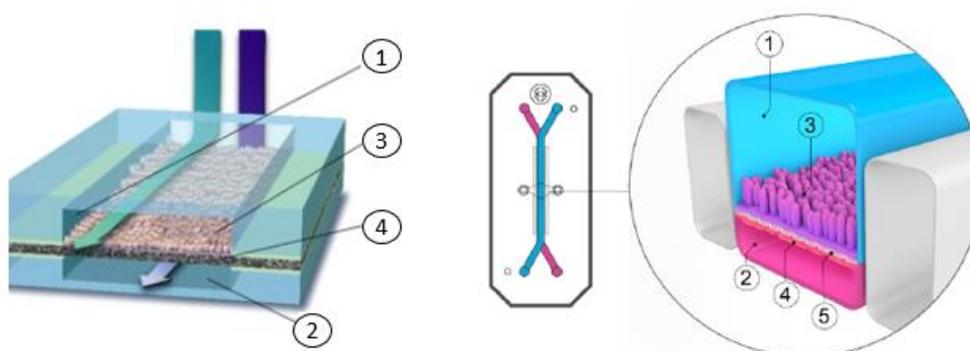
### 3.4.3. Les systèmes microphysiologiques

Les modèles de culture 2D et 3D de perméabilité intestinale présentés jusqu'ici ont été réalisés dans des conditions statiques. Or *in vivo*, l'environnement est dynamique, le bol

alimentaire est en mouvement et des paramètres comme l'écoulement des fluides ou les contraintes de cisaillement que les cellules reçoivent doivent être pris en compte.

Les modèles microphysiologiques (MPS) sont adaptés aux expositions chroniques puisqu'ils reproduisent l'approvisionnement constant en nutriments. Des modèles miniatures d'organe-sur-puce en système fluide sont un nouveau moyen d'évaluer *in vitro* l'efficacité d'absorption de xénobiotiques. Une molécule chimiothérapeutique destinée à être administrée par voie orale a pu être testée dans ce contexte (Pocock et al. 2017).

Les dispositifs de type intestin sur puce sont composés de deux canaux micro-fluidiques divisés par une membrane flexible poreuse recouverte d'une matrice extracellulaire qui est elle-même recouverte de cellules Caco-2 (Figure 36).



**Figure 36.** Description du dispositif « organe-sur-puce ». *Figure de Tan et al. 2018.*

Deux canaux (1) et (2) dont les flux circulent en continu sont orientés dans le même sens et sont séparés par une membrane poreuse (4). Une matrice extracellulaire (5) repose sur la membrane. Les cellules (3) adhèrent à la matrice et forment des villosités qui augmentent l'absorption.

Il est aussi possible de combiner les organoïdes et la technologie d'organe sur puce pour étudier les interactions entre médicaments. Là où un modèle statique informerait uniquement sur le transport des médicaments, la combinaison de deux modèles permettrait d'étudier simultanément l'absorption, le métabolisme et les interactions. Pour exemple, un modèle de duodénum sur puce utilisant des organoïdes a mis en avant l'utilité d'avoir une forte expression du CYP3A4 pour l'étude de la métabolisation des xénobiotiques (Kasendra et al. 2020).

#### 3.4.4. Les bioréacteurs

Les bioréacteurs représentent également un système dynamique qui met en culture des organoïdes ou cocultures en 3D. Les conditions dynamiques favorisent la différenciation des cellules Caco-2 en cellules ressemblant à des cellules épithéliales de l'intestin grêle (Pusch et al. 2011). Les divers formats de bioréacteurs sont présentés dans de nombreuses revues (H.-C. Chen et Hu 2006). Le système de bioréacteur à perfusion s'est révélé bénéfique pour la culture de cellules intestinales à long terme (S. S. Kim, Penkala, et Abrahimi 2007).

#### 3.5. Les modèles alternatifs *in silico*

L'ensemble des modèles *in vitro* en 2D ou 3D à haut débit et à plus ou moins faible coût génèrent une quantité de données importante qu'il faut ensuite analyser (Russo et al. 2019). Afin de répondre aux traitements de données en masse, des méthodes biostatistiques ont été mises au point. Les résultats quantitatifs sont triés, caractérisés par des coefficients de régression issus de modèles prédictifs (Edler et Ittrich 2003).

Plusieurs outils bio-informatiques ont fait émerger des modèles *in silico* pour l'évaluation de la toxicité (Burton et al. 2016). En analysant les paramètres obtenus par les modèles cellulaires *in vitro*, des systèmes de prédiction tels que PBPK peuvent calculer les propriétés de perméabilité de nouvelles molécules qui n'ont pas encore été testées. Par exemple, les données de coculture des Caco-2 et MDCK ont été ajoutées dans le modèle PBPK. Ce modèle est capable d'intégrer les paramètres physiologiques, anatomiques, chimiques et physiques des processus complexes d'absorption afin d'en prédire les effets.

De plus, l'*in silico* associé au « deep learning » ou aux intelligences artificielles rend possible de tester toutes les possibilités d'interaction entre 2 molécules et de désigner l'interaction la plus fréquemment retrouvée (Shin et al. 2018). Cette modélisation est utile pour discriminer des molécules de ciblage par exemple. L'informatique représente donc un atout non négligeable d'analyse, mais aussi de prédiction (H. Cai et al. 2006 ; Chiang et al. 2018).



## Chapitre 4 : Objectif de la thèse

Le transport et le passage des xénobiotiques dans la circulation générale sont entravés par les barrières d'organes et divers processus de protection physiques, chimiques et immunitaires. Ces mécanismes de protection sont déployés pour dégrader et métaboliser toutes les molécules du non-soi considérées comme sources de danger pour l'organisme. La compréhension du devenir des xénobiotiques permet de mieux appréhender les dérégulations qu'ils entraînent. Une avancée conséquente des techniques et des outils d'étude est à l'origine d'une disparité des résultats d'un laboratoire à un autre suivant la complexité des modèles employés.

Le projet de thèse que je vous décris dans ce manuscrit a pour objet de **présenter des modèles à mettre en place dans un laboratoire pour évaluer les effets et le devenir de xénobiotiques dans un contexte d'administration orale**. Cette thèse s'inscrit dans un consortium nommé MiBioGate qui vise entre autres objectifs, à développer de nouveaux outils de ciblage du microbiote ou de la barrière d'organes, et à identifier des biomarqueurs et des facteurs responsables de pathologies inflammatoires chroniques de l'intestin.

La première partie du travail de thèse a donc concerné l'étude d'agents thérapeutiques alternatifs aux anticorps. La première équipe, dans laquelle j'ai été accueillie, disposait d'une compétence particulière sur des protéines d'échafaudages vectrices, appelées affitines. Différentes affitines générées contre des immunoglobulines, biomarqueurs bactériens ou tumoraux étaient disponibles pour nous aider à réaliser notre étude (Béhar et al. 2019) (Kalichuk et al. 2018b). L'affitine candidate la plus appropriée aux objectifs du Consortium MibioGate concernait une affitine ciblant le lysozyme, une glycosidase produite par les granulocytes et monocytes qui possède des propriétés antibactériennes et anti-inflammatoires (Shimazaki et Takahashi 2018; Sherly Carolyn et al. 2019). Le lysozyme est décrit comme le marqueur le plus sensible de l'inflammation dans la maladie de Crohn (Müller, Autenrieth, et Peschel 2005; Haapamäki et al. 2006).

Les protéines sont très souvent administrées par voie parentérale, car l'acidité gastrique et les enzymes présentes dans le tractus digestif dégradent l'agent thérapeutique. Réussir à administrer une protéine par voie orale suscite donc un défi majeur pour l'administration de

médicaments. Lors d'une telle administration, les affitines vont transiter par la voie gastro-intestinale avant de rejoindre leur cible d'action, c'est pourquoi nous nous sommes concentrés sur la mise en place d'une barrière intestinale *in vitro* et l'utilisation de milieux mimant le compartiment gastrique et intestinal.

Pour réaliser ce travail, nous devons, en premier lieu, déterminer la méthode de dosage et de traçabilité adéquate pour suivre les affitines dans les différents compartiments qu'elles doivent traverser. Une fois la méthode déterminée, il est devenu possible d'évaluer leur comportement face à une monocouche de cellules épithéliales cultivées sur un insert Transwell.

En second lieu, nous nous sommes intéressés à la stabilité des affitines dans un environnement gastrique et intestinal. Notre postulat est que l'effet de la température et du pH des milieux synthétiques ne représente pas des conditions délétères pour les affitines puisqu'elles sont hautement stables (Béhar et al. 2013). En revanche, l'action de la pepsine et de la pancréatine peut présenter un obstacle conséquent pour l'administration orale.

L'objectif de mon travail a été de déterminer quelles actions ont ces protéases sur les affitines et comment, avec une ingénierie protéique, il est possible de s'affranchir des éventuelles coupures constatées (Article I). L'ensemble des travaux ont été effectués sur une affitine nommée H4 ciblant le lysozyme avant d'être étendus à d'autres familles d'affitines.

La seconde partie de ma thèse, réalisée dans une deuxième équipe d'accueil, s'est concentrée sur les problématiques soulevées par l'utilisation des herbicides. Les polluants de manière générale sont des xénobiotiques qui s'accumulent dans l'environnement et produisent des effets délétères sur la faune aquatique sans que cela ait été prémédité. Les larges utilisations de ces herbicides à travers le monde sont à l'origine d'une contamination des eaux de surface et des eaux souterraines qui sont destinées à la consommation humaine. La diversité des molécules sur le marché rend impossible de toutes les étudier et aucune méthode de screening en routine ne fait consensus. Alors que les études sur la faune aquatique sont nombreuses, peu de recherches sont effectuées pour la santé humaine. Un objectif sous-jacent de cette partie de thèse est de montrer qu'avec des méthodes simples et déjà validées par la communauté scientifique, il est possible d'évaluer une partie des effets

des polluants sur la santé humaine. Puisque le Consortium MibioGate s'intéresse en particulier aux barrières d'organe, nous avons concentré nos études sur la barrière intestinale.

Le prérequis de cette partie du projet de thèse était de déterminer quels herbicides inclure dans notre étude. En nous basant sur les données du BRGM, et en appliquant les critères de choix suivant, fréquence de détection, dépassement des seuils réglementaires, effets connus sur la faune et répartition géographique, nous avons retenu un inhibiteur de la photosynthèse (atrazine et ses métabolites DEA, DIA et DEDIA) et un inhibiteur de la synthèse des acides gras à chaîne longue (S-métolachlore et ses métabolites OXA et ESA). Entre 1992 et 2021, seules 77 publications sont ressorties avec les mots clés « human effects metolachlor » sur Pubmed à propos des effets du S-métolachlore chez l'Homme. Décrit comme « inclassable quant à la cancérogénicité » par l'ANSES, il convient donc de poursuivre les investigations sur ces molécules.

Notre premier objectif a été de regarder le potentiel d'induction de prolifération cellulaire par les deux herbicides et leurs métabolites de dégradation. L'investigation de ce paramètre sur des cellules intestinales humaines est réalisée pour la première fois.

Dans un second temps, nous avons cherché à évaluer les effets du métolachlore, de l'atrazine et de leurs métabolites sur la perméabilité membranaire de l'intestin (Article II en cours de rédaction). Comme pour les médicaments, ces herbicides vont entrer en contact avec la barrière intestinale. Ainsi, le modèle de monocouche de cellules épithéliales intestinales, précédemment mis au point est adapté. Notre intérêt s'est porté sur les principaux acteurs du maintien de l'intégrité membranaire que sont les protéines de jonction. Nous avons sélectionné une protéine d'adhérence, la E-cadhérine, et trois protéines de jonctions serrées, la Zonula Occludens 1, l'occludine et la claudine-1. Ces protéines de jonction sont des indicateurs de l'intégrité de la barrière intestinale. L'ensemble des travaux que nous avons réalisés évalue les effets des herbicides seul et/ou en cocktail, suite à une exposition aiguë et/ou chronique, et pour une faible et/ou forte concentration de produits, afin de se placer dans les conditions les plus proches de celles rencontrées au quotidien.

Dans un dernier temps, une évaluation transcriptomique a été menée afin d'identifier les expressions différentielles des gènes entre les cellules non exposées et celles exposées aux herbicides afin de valider nos observations.



## PARTIE 2 : MATERIELS ET METHODES

\*\*\*

### **Matériels biologiques**

Lors de ce projet, nous avons travaillé avec trois affitines H4, D1 et C3 développées au laboratoire. H4 cible une glycoside hydrolase (EC 3.2.1.17) nommée lysozyme, qui est sécrétée par les granulocytes et les monocytes. Cette glycosidase détruit la paroi bactérienne des bactéries Gram positif en catalysant l'hydrolyse des peptidoglycanes la constituant. D1 et C3 ciblent une immunoglobuline humaine (Tegeline) administrée principalement dans les cas de déficit immunitaire primitif et secondaire. Un anticorps (Tegeline) et un nanobodie (A1) ont été employés comme protéines de comparaison.

Nous avons aussi travaillé avec deux herbicides : le métolachlore (Mtc) et ses métabolites métolachlore-OXA (OXA) et métolachlore-ESA (ESA) ainsi que l'atrazine (Atz) et ses métabolites diéthyl-atrazine (DEA), déisopropyl-atrazine (DIA) et diéthyl-déisopropyl-atrazine (DEDIA).

Les protéines de jonctions regardées dans le cadre de l'évaluation de la perméabilité intestinale sont la zonula occludens (ZO-1), l'occludine (OCLN), la claudine-1 (CL-1) et l'E-cadhérine (E-cad). Des anticorps de lapin dirigés contre ces protéines ont été achetés chez Cell signaling. Ces anticorps fonctionnent aussi bien pour les techniques d'immunomarquage et de fluorescence. Un anticorps secondaire de souris anti-IgG de lapin et couplé à la Horseradish Peroxidase (HRP) ou à l'AlexaFluor488 est utilisé comme moyen de révélation, provenant eux aussi de chez Cell Signaling.

### **Génération des affitines**

Les affitines sont toutes produites au laboratoire dans un vecteur d'expression cytoplasmique et sont exprimées chez *E. coli*. Les purifications sont effectuées sur colonne d'affinité grâce à leur séquence RGS-6His présente en N-terminale puis par une chromatographie d'exclusion Superdex 75 (GE Healthcare). Les affitines sont conservées à -80°C. Les cibles des affitines telles que le lysozyme provient de chez Sigma-Aldrich et la tegeline nous a été aimablement fournie par Bernard Vanhove de l'Université de Nantes. L'anticorps anti-RGS-6His couplé à la HRP servant à la détection des affitines a été acheté chez Qiagen.

## Dosages protéiques

**Dosage spectrophotométrique**\_ Le tryptophane, et dans une plus faible mesure, la tyrosine absorbent à 280 nm. La phénylalanine et la cystéine ont aussi de faibles absorptions dans cette région des ultraviolets rapprochés. Il est donc possible de doser les protéines en mesurant l'absorbance à 280 nm. Pour le dosage de H4 et C3, nous avons réalisé une gamme de concentration de 0-1-2,5-5-10-20 et 50  $\mu$ M et mesuré les valeurs d'absorbances avec un NanoDrop (2000, Thermo Scientific).

**Dosage colorimétrique BCA**\_ L'acide bicinchoninique (BCA) met en œuvre une réaction de réduction de l'ion  $\text{Cu}^{2+}$  par les liaisons peptidiques des protéines. En formant ces complexes, il prend une couleur pourpre. La lecture de l'absorbance est réalisée à 562 nm après 2 h d'incubation. Le kit employé provient de chez Interchim (#UP40840A). Cette méthode de dosage a également été employée pour le dosage des protéines totales extraites de la lignée Caco-2.

**Dosage colorimétrique Bradford**\_ Bradford et al en 1976 ont développé une méthode basée sur l'absorbance du colorant bleu de Coomassie. Ce colorant interagit avec les protéines et la complexation provoque un transfert du pic d'absorption qui passe des longueurs d'onde du domaine rouge au domaine bleu en présence d'acide formique. L'interaction se fait principalement avec des AA basiques (Arginine, Histidine, et Lysine) et des AA hydrophobes. La lecture de l'absorbance s'effectue après 5 min d'incubation à l'obscurité à 595nm. Nous avons utilisé un kit de chez Biorad (Quickstart Bradford, # 500-0006) pour réaliser le dosage.

**Dosage immuno-enzymatique**\_ La méthode ELISA (de l'anglais Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) nous a permis de vérifier l'affinité des affitines pour leur cible lorsque des modifications leur sont apportées. Nous avons également évalué la méthode de dosage direct par un ELISA-like en adsorbant directement les affitines à la place de leur cible.

Pour chaque expérience, un protocole similaire a été appliqué. Plusieurs incubations se succèdent, séparées par des lavages au PBS 1X. Dans un premier temps, une incubation de 1h a lieu pour fixer 1  $\mu$ g de la cible (0,1x10  $\mu$ g/mL) dans une plaque 96 puits Maxisorp. Une étape de saturation sur la nuit est réalisée avec une solution de PBS-BSA 0,5 % avant d'ajouter une concentration variable en affitine H4, C3 ou D1 (entre 50 et 1 000 nM) pendant 1 h. Dans le cas de l'absorption directe des affitines, le protocole est légèrement modifié puisque dans un

premier temps, sans incubation préalable de la cible, H4, C3 et D1 sont directement incubées 1 h sur la plaque Maxisorp avec une gamme de concentration de 50 à 1000 nM suivie de l'étape de saturation sur la nuit. Enfin, un anticorps anti-RGS-6His couplé à de la HRP (1/10 000) est incubé 1h et suivi de l'ajout d'une solution composé d'o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) et de peroxyde d'hydrogène. L'OPD est oxydé par la HRP avec du peroxyde d'hydrogène. Les fonctions amines deviennent des fonctions imines et donnent lieu à la formation de doubles liaisons conjuguées, ce qui rend l'OPD chromophore. Ce substrat produit un composé soluble de couleur jaune orangé qui peut être lue par spectrophotométrie à 450 nm.

Pour le dosage du Mtc et de l'Atz, nous avons suivi le protocole recommandé par le fournisseur de kit NOVAKITS.

### Marquage des affitines

Le lieu de fixation et la quantité fixée varient en fonction de la protéine et du nombre de résidus présents dans la séquence peptidique des affitines. Les premières cibles envisagées sont les lysines, car elles sont abondantes et présentes dans toutes les affitines que nous étudions. La multiplicité des sites de marquage permet d'augmenter l'intensité de fluorescence visible lors de la détection. Cependant, la quantification du nombre de molécules d'Alexa fixées n'est pas envisageable, car il est possible d'obtenir aussi bien aucune, une ou plusieurs molécules d'Alexa par affitine, nous parlerons plutôt d'un degré de marquage, le DOL (degree of labeling). Les molécules d'Alexa peuvent être fixées aux protéines à des rapports molaires élevés sans auto-extinction significative, conduisant à des conjugués plus brillants et à une détection plus sensible. Le calcul du DOL a été le suivant :

$$\text{Mole de fluorescence par mole de protéines} = \frac{A_{647} \times \text{facteur de dilution}}{\epsilon \times \text{concentration en protéines (M)}}$$

Notons que le coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon$ ) de l'AlexaFluor647 NHS est de  $270\,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  tandis que celui de AlexaFluor647 maléimide est de  $265\,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ .

Dans le cas où la multiplicité des marquages sur une même protéine entraîne une diminution d'affinité de l'affitine pour sa cible, nous avons également réalisé un marquage sur les groupements thiols présents en C terminal de l'affitine D1.

L'AlexaFluor647<sup>®</sup> NHS ester et l'AlexaFluor647<sup>®</sup> maléimide (ThermoFischer) sont donc les deux molécules fluorescentes que nous avons sélectionnées. AlexaFluor647<sup>®</sup> est une molécule de 1250 Da qui émet de la fluorescence dans le domaine du visible au niveau du rouge lointain avec une longueur d'onde d'excitation idéale du laser de 651nm et d'émission de 672 nm. Selon les échantillons, environ 11-12 nmol d'affitine diluées dans NaHCO<sub>3</sub> sont incubées avec 8 à 32 nmol AlexaFluor647 pendant 5 à 10 min à température ambiante. Une étape de purification est ensuite réalisée sur des colonnes de dessalage en polyacrylamide (7 kDa, Pierce, Thermo Scientific, #89849) préalablement équilibrées avec soit du PBS (pour les marquages à l'AlexaFluor647-maléimide) soit du TBS (pour les marquages à l'AlexaFluor647-NHS). Une courte centrifugation de 1500 g pendant 2 min permet non seulement de retirer l'excès de composé fluorescent mais aussi de récupérer les affitines marquées dans le tampon de stockage adapté (PBS ou TBS).

### **Digestion gastrique et intestinale**

Pour imiter les fluides intestinaux et gastriques avant et après un repas, nous avons employé une préparation de chez Biorelevant nommé FaSSIF (Fasted State Human Intestinal Fluid), FeSSIF (Fed state simulating intestinal fluid), FaSSGF (Fasted state simulated gastric fluid). Tous ces milieux sont composés en proportion variable de sodium taurocholate (TC), lécithine, chlorure de sodium (NaCl), hydroxyde de sodium (NaOH) et dihydrogénophosphate de sodium (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

**Milieu mimant l'estomac**\_ Pour préparer la solution de milieu gastrique synthétique correspondant à FaSSGF (estomac à jeun), nous avons mélangé 0,06 mg/mL de poudre FaSSIF, FeSSIF & FaSSGF dans une solution de 34,2 mM NaCl/HCl de pH 1,6. Nous avons ensuite réalisé extemporanément la solution finale contenant la pepsine. Différentes concentrations en pepsine ont été testées (de 0,025 à 3,2 mg/mL). Les affitines sont mises dans le milieu gastrique synthétique à une concentration finale de 0,5mg/mL puis sont incubées à différents temps (1- 10- 30- 60- 120- 180- 240- 300 min) à 37°C sous agitation. La réaction est stoppée avec une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 200 mM. Les échantillons témoins n'ayant pas eu de digestion sont mélangés directement à t<sub>0</sub> avec Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 200 mM. Enfin, les échantillons sont déposés sur un gel SDS-PAGE.

**Milieu mimant l'intestin**\_ Afin de préparer la solution mimant le milieu intestinal, nous avons préparé le milieu correspondant à FaSSIF (intestin à jeun) de chez Biorelevant. Nous avons mélangé 2.24 mg/mL de poudre FaSSIF, FeSSIF & FaSSGF dans une solution de NaOH (10 mM), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (28,66 mM) et NaCl (105,88 mM). La solution finale doit être à pH 6,5. Nous avons ensuite réalisé extemporanément la solution finale contenant différentes concentrations en pancréatine (de 0,01 à 10 mg/mL). Les affitines sont mises dans le milieu intestinal synthétique à une concentration finale de 0,5 mg/mL puis sont incubées à différents temps (10- 30- 60- 120- 180 min) à 37 °C sous agitation. La réaction est stoppée par chauffage à 100°C. Les échantillons témoins n'ayant pas eu de digestion sont directement, à t<sub>0</sub>, mis à 100°C. Enfin, les échantillons sont déposés sur un gel SDS-PAGE.

### Electrophorèse SDS-PAGE

Les affitines ont un poids moléculaire d'environ 10 kDa (7 kDa additionnés de la séquence RGS-6His). Nous avons réalisé des gels à 15 % d'acrylamide pour le gel de séparation et 4 % d'acrylamide pour le gel de concentration. Les affitines sont préparées à différentes concentrations. Un tampon de charge composé de Tris 250 mM, SDS 10 %, glycérol 50 %, β-mercaptoéthanol et bromophénol 0,5 % à pH 6,8 est ajouté puis les échantillons sont incubés à 95 °C pendant 10 min afin de favoriser la dénaturation. Après avoir déposé les échantillons et le marqueur de taille « precision plus protein standards all blue » (BioRad), la migration des gels se fait dans des cuves d'électrophorèse contenant du tampon de migration (Tris 25 mM, SDS 0,1 %, glycine 250 mM à pH 8,3) pendant 55 min à 150 V. Les gels sont ensuite colorés au Bleu de Coomassie et décolorés dans l'eau avant d'être imagés sur le système ChemiDoc.

Afin d'obtenir un meilleur pouvoir résolutif pour les bandes inférieures à 10 kDa, nous avons optimisé le gel en modifiant de nombreux paramètres (Tableau 7).

**Tableau 7.** Différents paramètres testés pour réaliser un gel SDS-page plus résolutif

Gel de séparation	Urée	Acrylamide	Tris HCl	Glycérol	Glutaraldéhyde
12 %	2,5 M	30 %	1,5 M pH 8,8	100 %	5 %
15 %	3 M	40 %	3 M pH 8,8	50 %	2,5 %
18 %	4,2 M		3 M pH 8,45	10 %	Sans

Les conditions qui diffèrent d'un gel conventionnel et que nous avons retenues sont un gel à 10 % contenant 4,2 M d'Urée, 30 % d'acrylamide, 10 % de glycérol et un tampon Tris-HCl 3 M à pH 8,45. Une étape supplémentaire de fixation au glutaraldéhyde 2,5 % est effectuée avant l'étape de coloration.

### **Spectrométrie de masse (MS)**

Les affitines à 0,5 mg/mL ont été préparées avec ou sans digestion à la pepsine. Un gel d'électrophorèse est réalisé pour s'assurer que les protéines ont bien été digérées par la pepsine et que les témoins ne présentent pas de digestion.

Sur la plateforme de spectrométrie de masse, un mélange 1 : 1 de TCEP et d'échantillon sont mis dans des restricteurs (Macherey Nagel) adaptés au spectromètre de masse. L'analyse des affitines digérées ou non a été réalisée sur un spectromètre de masse Q-TOF Synapt™ G2 HRMS équipé d'une interface d'ionisation électrospray (ESI) fonctionnant en mode positif et d'un dispositif Acquity H-Class® UPLC™ (Waters Corporation, Milford, MA, USA).

Les affitines préalablement incubées ou non avec la pepsine ne sont pas introduites directement dans la source d'ionisation, une méthode séparative a été employée. Deux types de colonnes de chromatographie liquide ont été utilisées en fonction de l'objectif visé. Pour identifier le nombre de fragments générés lors d'une digestion à la pepsine, nous avons utilisé la LC-HRMS (Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse Haute Résolution) avec une colonne BEH C4. Pour identifier précisément les AA touchés par le clivage de la pepsine, nous avons utilisé la LC-MS/MS (Chromatographie liquide couplée à la Spectrométrie de Masse en tandem) avec une colonne BEH C18 (1,7µm ; 2,1 x 100 mm). Les peptides ont été séparés avec un gradient linéaire de la phase mobile B (100 % acétonitrile) dans la phase mobile A (5 % acétonitrile), chacune contenant 0,1 % d'acide formique, et à un débit de 400 µL/min. La phase mobile B a été maintenue constante à 1 % pendant 1 min, puis augmentée linéairement de 1 % à 99 % pendant 10 min, maintenue constante à 99 % pendant 1 min, ramenée à la condition initiale pendant 1 min, et maintenue constante pendant 2 min avant l'injection suivante. La température de la colonne a été maintenue à 60 °C pendant toute la durée du cycle.

Les peptides ont ensuite été détectés par le spectromètre de masse avec l'interface ESI fonctionnant en mode ion positif (tension capillaire, 3 kV ; débit et température du gaz de

désolvatation (N<sub>2</sub>), 900 L/h et 400 °C ; température de la source, 150 °C). Les données ont été acquises à la vitesse de 4 spectres/sec et la fenêtre d'acquisition a été réglée de m/z 50 à 4000. L'ionisation des échantillons par électrospray permet l'obtention des ions multichargés, notamment dans le cas des protéines. Cette source d'ionisation permet l'analyse de biomolécules à hauts poids moléculaires en fonction du rapport masse sur charge (m/z). Cependant, pour les biomolécules de plus de 2 000 Da telles que les affitines (10 kDa), les forts états de charge générés (> 40) sont délétères pour la précision de la mesure. Il est donc nécessaire d'utiliser un système analyseur à haute résolution tel que le temps de vol (TOF).

Les conditions d'analyse en MS/MS avec des ions précurseurs à hauts états de charge se fragmentent moins bien dans la cellule de collision rendant l'identification de l'enchaînement en AA moins efficace. C'est pourquoi, les échantillons dans ces conditions ont reçu une digestion supplémentaire avec la trypsine pour réduire leur taille de façon contrôlée à l'échelle du peptide (500 à 2000 Da). Les peptides présenteront ainsi de plus faibles états de charge (1, 2 à 3) et une bien meilleure fragmentation en mode MS/MS. Les principaux ions précurseurs ont été sélectionnés en fonction de leur m/z spécifique, puis fragmentés avec une énergie de collision fixée à 30 V. Les distributions d'états de charge multiples des protéines intactes ont été déconvoluées à l'aide du logiciel MaxEnt1 (Waters Corporation) et les spectres MS/MS générés ont été analysés manuellement pour déterminer la couverture de séquence de chaque protéine.

### **Dichroïsme circulaire (CD)**

La spectroscopie CD dans l'ultraviolet lointain a été utilisée pour déterminer les structures secondaires des affitines, mais aussi pour évaluer leur stabilité à différents pH et températures. Les mesures ont été effectuées avec un instrument Jasco J-810 (Jasco, Lisses, France), en utilisant une cellule de quartz avec une longueur de trajet de 0,2 cm (Hellma, Paris, France). Pour la stabilité du pH, des affitines à 0,25 mg/mL ont été incubées pendant une nuit à température ambiante dans un tampon phosphate de sodium 20 mM avec un pH allant de 4 à 10 ou dans du HCl 1N pour un pH 0. Les spectres CD ont été réalisés à 20 °C. Pour le traitement des données, trois balayages consécutifs ont été collectés pour chaque mesure de 210 à 250 nm. Les données ont été recueillies sous forme d'ellipticité en unités de millidegrés (mdeg) en fonction de la longueur d'onde (nm). Le dépliage thermique a été suivi à 222 nm dans un tampon de phosphate de potassium, pH 7,4, dans un mode de mesure de

température allant de 20 à 95 °C avec une vitesse de balayage de 1 °C/min. Les données ont été recueillies sous forme d'ellipticité en unités de mdeg en fonction de la température (°C).

### **Western-blot**

Une membrane de nitrocellulose de 0,45 µm (Whatman, #10401196) a été utilisée pour la détection des affitines et une membrane polyfluorure de vinylidène de 0,45 µm (PVDF) (Immobilon-P membrane Merck IPVH00010) activée avec du méthanol a été privilégiée pour la détection des protéines de jonction exposées aux polluants. Le gel d'électrophorèse, les membranes, les éponges et les papiers filtres sont équilibrés avec le tampon de transfert froid (Tris, Glycine, SDS 1X + 20 % éthanol) avant d'être montés dans la cassette du Transblot (BioRad mini protean). Le transfert des affitines est programmé à 100 V pendant 1 h. Pour l'étude des protéines de jonction, les paramètres de temps de transfert, de voltage et de pourcentage du gel de séparation ont aussi été modifiés. Une migration forte à 300mA pendant 3h est utilisée pour les protéines ZO-1 tandis qu'un transfert plus doux sur la nuit est réalisé pour la CL-1. Les deux conditions de transfert conviennent pour les protéines E-cad et OCLN ainsi que la protéine témoin actine.

Après 3 lavages au PBS, une solution de blocage est mise à incuber avec la membrane sur la nuit à 4 °C ou 2 h à température ambiante. La solution de blocage correspond à un mélange entre une poudre de blocage fournie avec l'anticorps anti-RGS-6His (Qiagen), du PBS et du Tween 20 à 0,1 % pour les transferts d'affitine et entre du TBS, BSA à 5 % et Tween 20 à 0,1 % pour les protéines de jonction. Les protéines de jonction nécessitent une incubation d'une nuit à 4 °C avec l'anticorps primaire, tandis que les affitines n'en ont pas besoin. Après plusieurs lavages au PBS-Tween ou TBS-Tween, un anticorps secondaire anti RGS-6His couplé à la HRP (pour les affitines) ou un anticorps secondaire anti-IgG couplé à la HRP (pour les protéines de jonction) est incubé pendant 2 h à l'abri de la lumière. La détection des affitines et des protéines de jonction est réalisée avec un kit Clarity western ECL (Bio-Rad, # 170-5060) et l'acquisition des images est obtenue avec un lecteur ImageLab de chez BioRad.

### **Culture cellulaire**

Une lignée de cellules épithéliales d'adénocarcinome de côlon humain (Caco-2) a été cultivée à 37 °C et 5 % de CO<sub>2</sub>, dans un milieu DMEM 4,5 g/L de glucose et pyruvate, enrichi en L-glutamine (2 mM), 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 100 U/mL de pénicilline et

streptomycine. Toutes les expériences ont été réalisées avec des cellules entre le passage 51 et 63. Chaque passage a été effectué avec de la trypsine lorsque la flasque atteignait 70 à 80 % de confluence. Nos cellules sont contrôlées mycoplasme négatif par qPCR suite à une extraction de l'ADN automatisée par le Quiacub (kit DNeasy Blood & Tissue Quiagen, # 69506). Le milieu est changé tous les 2 ou 3 jours.

### Test de cytotoxicité

**Méthode MTT**\_ La toxicité des affitines pour l'étude de la perméabilité a été déterminée avec du méthyle thiazol tetrazolium (MTT). Dans une plaque 96 puits transparents à fond plat Maxisorp (Falcon), 10 000 ou 20 000 cellules sontensemencées par puits. Après 24 ou 48 h d'incubation à 37 °C, les cellules de chaque puits ont été traitées avec différentes concentrations en affitines ou herbicides (0 à 50 µM) et en contrôle positif DMSO (0 à 20 %). A la fin de l'incubation à 37 °C, une solution de MTT est incubée 3h30 à 37 °C. Les cristaux violets correspondant à la formation de formazan par les mitochondries sont resolubilisés dans du DMSO et mis sous agitation. L'absorbance a été mesurée à 555 nm sur le TECAN pour les affitines et 570 nm avec un lecteur de plaque VICTOR pour les herbicides. La viabilité cellulaire est calculée comme suit :  $(A_{\text{protéine}} - A_{\text{DMSO}})/(A_{\text{blanc}} - A_{\text{DMSO}}) * 100$ .

**Méthode ATP**\_ Dans une plaque 96 puits de culture à fond blanc (Greiner), 10 000 cellules sontensemencées par puits. Après 24 h, des gammes de polluants de 0 µM à 50 µM sont ajoutées et incubées à 37 °C pendant 24 h. Une solution de CelltiterGlow (Promega) à 100 mM est déposée directement dans les puits. Une agitation de 2min sur un agitateur orbital permet de mélanger doucement le milieu. Après une courte incubation de 10min à température ambiante pour stabiliser la bioluminescence, la luminescence est lue avec un lecteur de plaque VICTOR X3 (PerkinElmer).

### Extraction des protéines

Dans des plaques 6 puits transparentes (Nunclon), 300 000 cellules sontensemencées par puits pour une culture de 7, 14 ou 21 jours. Les cellules sont exposées avec les herbicides soit en chronique dès le lendemain de l'ensemencement soit en aigu 24h avant l'expérience. Différentes concentrations en herbicides ou métabolites (0 ; 0,5 ; 1 ou 10 µM) et cocktails (0,5 ou 1 µM) sont exposées sur les cellules. Les cellules en fin de culture sont ensuite lavées avec du PBS puis du tampon RIPA contenant un cocktail d'antiprotéases (Thermo Scientific,

#87785) est ajouté dans chacun des puits. Le tampon RIPA est composé de NaCl 150 mM, Tris HCl 50 mM pH 7,4, Nonidet P-40 1 %, sodium deoxycholate 0,5 % et de SDS 0,1 %. Avec un Cellscrapper (VWR), les cellules sont grattées puis incubées dans la glace pendant 30 min. Une centrifugation de 30 min à 21 000 g permet de culotter les débris cellulaires. Le lysat est ensuite transféré dans des tubes propres puis conservé à -20 °C jusqu'au dosage protéique.

Différentes conditions de décollement des cellules ont été évaluées en plus de la méthode physique de grattage pour déterminer les conditions optimales de récupération des protéines de jonction. Des solutions plus ou moins décapantes comme la trypsine, la versène et l'acutase, ont pu être testées.

### **Extraction des ARN**

Les ARN sont extraits avec un kit Nucleospin (Macherey-Nagel). Tout d'abord, dans des plaques 6 puits transparentes (Nunclon), 300 000 cellules sontensemencées par puits pour une culture de 14 jours. Les cellules sont exposées avec les polluants (0,5 µM et 10 µM) de façon chronique en changeant le milieu tous les 2 ou 3 jours avec les herbicides. Les cellules en fin de culture sont ensuite lavées avec du PBS puis du tampon de lyse, provenant du kit Nucleospin et contenant du β-mercaptoéthanol, est ajouté dans chacun des puits. Avec un Cellscrapper, les cellules sont grattées puis conservées avec le tampon de lyse à -20 °C jusqu'à l'étape d'extraction des ARN.

Le protocole se compose de plusieurs étapes de lavages et centrifugation sur colonne afin de filtrer, modifier le pH, faciliter la liaison de l'ARN sur la colonne, dessaler et supprimer les ADN. L'élution finale permet de récupérer 60 µL d'ARN avec de l'eau sans RNase. Un dosage est ensuite réalisé au Nanodrop à 260 nm afin de connaître la concentration en ARN, mais également vérifier qu'il n'y a pas de contamination par des protéines. Pour cela, nous regardons le ratio 260/280. Les échantillons sont ensuite conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

### **Prolifération cellulaire**

Un système xCELLigence RTCA (Agilent) a été utilisé pour suivre sans marquage et en temps réel le processus de croissance et prolifération des cellules. Par mesure de l'impédance dans le maillage de microélectrodes en or au fond des puits, l'augmentation progressive de l'occupation de la surface du puits se traduit par un changement d'impédance. Cette méthode

est directement proportionnelle à la morphologie cellulaire, à la qualité de l'étalement, de l'adhésion ainsi qu'au nombre de cellulesensemencées.

Conformément aux instructions du fabricant, avant le début de l'expérience, du milieu DMEM a été ajouté dans les 96 puits de la plaque E (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA) et équilibré à température ambiante. La plaque a été placée dans le support de plaque dans un incubateur humidifié à 37 °C avec une atmosphère de CO<sub>2</sub> à 5 % pour établir une lecture du bruit de fond. Ensuite, les cellules Caco-2 ont étéensemencées dans les plaques à une densité de 5 000 cellules par puits. Après 24 h, les polluants et cocktails sont ajoutés à des concentrations finales de 0,1 à 50 µM pendant 180 h. L'impédance électrique a été mesurée par le logiciel intégré RTCA du système xCELLigence.

### **Perméabilité membranaire**

Des cellules Caco-2 ont été cultivées pendant 21 jours jusqu'à obtenir des monocouches confluentes dans un système de filtres Transwell (6,5 mm, 24 puits, 0,4 µm, Costar, #3470), comme décrit par (Hubatsch, Ragnarsson, et Artursson 2007). La résistance électrique transépithéliale (TEER) a été contrôlée au minimum une fois par semaine comme le décrit (Angelis et Turco 2011). Des électrodes sont placées dans le milieu de culture, à la fois dans le compartiment inférieur et dans le compartiment supérieur et la résistance électrique est indiquée par l'Ohmmètre EVOM2 (Millicell-ERS, Millipore). Seuls les inserts avec une valeur de TEER supérieur à 1000 Ω·cm<sup>2</sup> ont été utilisés pour les études de perméabilité et de transport. Les études de perméabilité sont effectuées dans un milieu HBSS (solution saline équilibrée de Hank) pour les affinitines et dans le DMEM pour les herbicides.

**Lucifer yellow**\_ Pour regarder l'intégrité de la monocouche de Caco-2, nous avons mesuré le passage passif de la Lucifer Yellow (LY), un marqueur de la voie paracellulaire. Le protocole consiste à ajouter 0,1 mg/mL de LY du côté apical de l'insert puis de recueillir un échantillon en basolatérale après 3h d'incubation. Le LY est mesuré par détection fluorimétrique à 485nm d'excitation et 535nm d'émission avec le lecteur de plaque VICTOR.

**Acide sulfonique-Fluorescéine**\_ Des études de perméabilité paracellulaire (c'est-à-dire à travers les jonctions serrées) ont été réalisées en évaluant le flux de fluorescéine-5(et 6)-sulfonique-acide à 0,5 mg/mL final (Invitrogen) ajouté dans le compartiment apical d'une monocouche de Caco-2 exposée aux polluants pendant 24 h (condition aiguë) ou 14 jours

(condition chronique). Des échantillons ont été régulièrement prélevés du côté basolatéral de l'insert Transwell, de 1 h à 24 h. Après chaque prélèvement, le volume prélevé a été réintroduit dans le compartiment basolatéral, afin de ne pas induire de déséquilibre du flux de fluide dans le système. Les valeurs de fluorescence mesurées à 485 nm d'excitation et 535 nm d'émission (VICTOR) sont directement proportionnelles au changement de perméabilité de la monocouche cellulaire.

### **RT-qPCR**

La concentration et la pureté de l'ARN ont été déterminées par spectrophotométrie à l'aide du Nanodrop (Thermo Fisher Scientific). La transcription inverse a été réalisée avec 1 µg d'ARN à l'aide du kit QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) pour générer l'ADNc. La PCR quantitative en temps réel a été réalisée sur le système de détection Mycycler real-time PCR (Bio-Rad) en utilisant le Power up Sybr green (Applied Biosystem). Les amorces pour l'amplification par PCR ont été conçues à partir de la base de données NCBI et listées dans le Tableau en Annexe V.

L'expression de l'ARNm des gènes des protéines de la jonction serrée : claudine-1, occludine, zonula occludens-1 et E-cadhérine ont été normalisée par rapport à l'ARN de l'actine en utilisant la méthode de Pfaffl (Pfaffl 2001). Les données de la qPCR ont été quantifiées sur la base du nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence générée par l'amplification atteigne un seuil de détection spécifique (valeur Ct). La valeur Ct moyenne pour chaque gène a été quantifiée par rapport à l'actine ( $\Delta Ct$ ), puis la valeur du  $\Delta\Delta Ct$  a été calculée par l'équation suivante :  $\Delta Ct$  cellules traitées –  $\Delta Ct$  non traitées. Le changement d'expression normalisé est exprimé en fold change =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### **Séquençage des ARN**

La réalisation du RNAseq et les premières analyses ont été faites par l'entreprise ActiveMotif. L'ARN est isolé puis traité à la DNase sur une colonne. Les librairies sont préparées à l'aide de préparation des échantillons d'ARNm TruSeq. La première étape du processus consiste à purifier les molécules d'ARNm qui possède une séquence poly-A grâce à l'utilisation de billes magnétiques fixées à une oligo-dT. Après la purification, l'ARNm est fragmenté en petits morceaux à l'aide de cations divalents à température élevée. Les fragments d'ARN clivés sont copiés en ADNc de premier brin à l'aide de transcriptase inverse

et d'amorces aléatoires. La synthèse de l'ADNc du second brin est ensuite réalisée à l'aide de l'ADN polymérase I et de la RNase H. L'ADNc peut alors être synthétisé. Les fragments d'ADNc subissent ensuite l'ajout d'une seule base 'A'. Seul le premier brin est amplifié parce que le dUTP a été incorporé dans le second brin et bloque l'extension de la polymérase. Les produits sont ensuite purifiés et enrichis par PCR pour créer la bibliothèque finale d'ADNc. Un contrôle qualité des ARN est effectué par TapeStation (équivalent de Bioanalyzer) Numéro d'intégrité de l'ARN (RIN) et par mesure de la concentration par dosage fluorométrique (Q-bit).

Les comparaisons par paires ont été effectuées avec le progiciel DESeq2 (Love, Huber, et Anders 2014). Pour les comparaisons avec des répliques, un test de Wald a été utilisé pour déterminer la significativité, et tout gène dont la valeur p-value était inférieure à 0,1 a été considéré comme différemment exprimé. Pour les comparaisons sans réplicat, les gènes exprimés de manière différentielle avaient une variation logarithmique rétrécie supérieure à 0,3.

### **Immunofluorescence**

Dans des plaques 96 puits noirs à fond transparent (Perkins Cell Carrier ultra), 10 000 cellules sont ensemencées par puits pour une culture allant de 5 à 14 jours. Les cellules sont exposées avec 0,5 ou 10  $\mu$ M de Mtc et Atz soit en chronique dès le lendemain de l'ensemencement soit en aigu 24h avant l'expérience. Avant de réaliser les marquages, les cellules sont lavées au PBS. Brièvement, les cellules sont fixées au paraformaldéhyde à 4 % (PFA) à température ambiante pendant 20 min, puis elles sont perméabilisées avec du Triton-X100 à 0,1 % pendant 10 min. Le blocage s'effectue dans une solution de PBS-BSA 3 % pendant 1 h.

Les protéines de jonction ont été marquées avec des anticorps de lapin anti-ZO-1 (1 : 300), anti-claudine-1 (1 : 400), anti-occludine et anti-E-cadhérine (1 : 600), dilués dans du PBS-BSA 3 %. (Cell Signaling Technologies). Les noyaux ont été colorés à l'aide du 4'-6-diamidino-2-phénylindole dihydrochloride (DAPI) (Life Technologie). Comme anticorps secondaires, des anticorps de souris anti-IgG de lapin couplé à l'Alexa488 (Cell Signaling Technologies) ont été utilisés. Les cellules ont été imagées avec un système d'imagerie à haut contenu Operetta CLS (PerkinElmer) à un grossissement de 10x et 63x. Les noyaux ont été dénombrés à l'aide du

logiciel d'analyse Harmony et les intensités de fluorescence correspondant à ZO-1 ont été analysées avec la séquence Harmony suivante :

1. [Find Nuclei]—Channel: *DAPI*; Method: *C*; Output Population: *Nuclei*
2. [Select Population]—Population: *Nuclei*; Method: *Common Filters (Remove Border Objects)*; Output Population: *Nuclei Selected*
3. [Filter image]—Population: *Nuclei Selected*; Method: *Common Filters (gaussian smoothed)*; Output image: *Nuclei Selected*
4. [Filter image]—Population: *Nuclei Selected*; Method: *Common Filters (SER Ridge)*
5. [Find Cells]—Channel: *A488*; Method: *C*; Output Population: *Cells*
6. [Calculate intensity properties] —Population: *Cells*; Output properties intensity: *Cells A488 mean*
7. [Select Population]—Population: *Cells*; Method: *C*; Output Population: *A488*
8. [Define Results]

### **Analyses statistiques**

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7. Les différences entre les groupes ont été analysées par un test de comparaison multiple (ANOVA one way, bilateral) avec la correction de Dunnett, dans les expériences d'immunofluorescence. Des tests de Student (t-test) ont été effectués dans les expériences de qPCR.

Les résultats ont été considérés comme significatifs lorsque la P-value < 0,05 (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*). Sauf indication contraire, les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (ET).



## PARTIE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

\*\*\*

## **Chapitre 1 : Administration orale d'une protéine alternative aux anticorps**

### **1. Caractérisation du comportement de protéines d'affinité artificielle dans le système gastro-intestinal**

#### **1.1. Préambule**

Le système gastro-intestinal représente une barrière majeure à l'absorption orale des agents thérapeutiques. En partant de la sphère orale avec un pH de 6,8 et terminant leur chemin dans le colon avec un pH de 8,1, les biomédicaments vont successivement entrer dans le compartiment gastrique puis intestinal. Les affitines, ces protéines aux propriétés similaires à celles des anticorps n'ont encore jamais été étudiées dans le cadre d'une administration orale. Un ensemble de questions relatives à leur résistance gastro-intestinale, à leur innocuité pour les cellules épithéliales et leur capacité à traverser la barrière intestinale demeurent. Dans notre projet, nous avons pris le parti d'utiliser des milieux exclusivement synthétiques pour évaluer le comportement des affitines confrontées à des conditions désavantageuses en soluté, pH et protéases.

L'épithélium intestinal et sa fonction de perméabilité sélective confèrent une seconde barrière efficace à l'absorption des biomolécules. Comme expliqué dans l'introduction, les affitines sont 10 fois plus petites qu'une immunoglobuline et sont par conséquent susceptibles de traverser la barrière intestinale. Partant de ce postulat, il est indispensable d'avoir une méthode de détection efficace pour suivre les affitines dans les différents compartiments qu'elles vont traverser. En nous basant sur les groupements fonctionnels aromatiques et thiols des résidus protéiques des affitines, nous avons exploité les caractéristiques spectrophotométriques des protéines. Cherchant à améliorer la sensibilité du dosage des affitines, nous avons fait des marquages avec des groupements chimiques émetteurs de fluorescence. L'ensemble des méthodes de dosage sont comparées pour déterminer la méthode la plus sensible et valider la méthode la plus adéquate au suivi des affitines dans un système biologique utilisant une lignée cellulaire épithéliale colorectale (Caco-2). Les études de perméabilité membranaire ont été effectuées avec trois affitines désignées H4, C3 et D1.

Ces trois affitines ont été choisies dans notre étude car elles proviennent de la même famille Sac7d mais possèdent des cibles différentes. H4 est l'une des premières affitines décrites et les études soulignent son potentiel comme inhibiteur enzymatique anti-glycosidase (Correa et al. 2014). D1 et C3 se lient à différents épitopes des IgG et se placent comme vecteur potentiel véhiculant des radionucléides.

## 1.2. Résultats

### 1.2.1. Choix de la méthode de dosage et suivi des affitines

Les affitines ont une séquence protéique riche en AA aromatiques (tyrosine et tryptophane) qui absorbent à la longueur d'onde 280 nm. Les dosages basés sur l'absorbance donnent une sensibilité de l'ordre du micromolaire ( $\mu\text{M}$ ). En tenant compte de la limite de détection inerrante au spectrophotomètre (Absorbance=0.1), la limite de quantification directe à 280 nm est de 10  $\mu\text{M}$  pour H4 et 40  $\mu\text{M}$  pour C3 (Figure 37A).

Les méthodes colorimétriques n'offrent pas une meilleure sensibilité puisque la limite de quantification est respectivement de 10  $\mu\text{M}$  et 20  $\mu\text{M}$ , à la fois pour H4 et C3, pour un dosage de Bradford et un dosage BCA (BiCinchoninic acid Assay) (Figures 37B et 37C). Si l'on s'attache à la zone de linéarité ( $R^2=0,99$ ), le dosage direct à 280 nm et le dosage de BCA donnent une large gamme allant de 0 à 50  $\mu\text{M}$  contrairement au dosage Bradford qui est de 0 à 15  $\mu\text{M}$  et qui impose de réaliser des dilutions pour être dans cette gamme. Il apparaît que la méthode de dosage Bradford n'est pas adaptée pour notre projet en raison d'une trop faible reproductibilité. Néanmoins le dosage BCA n'est pas satisfaisant non plus puisque les valeurs d'absorbances n'excèdent pas 0,3.

Une autre méthode de dosage pour les protéines est la méthode immuno-enzymatique ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Ce dosage correspond au nombre d'affitine liée avec sa cible spécifique fixée sur une plaque. Cette méthode est plus sensible que les précédentes puisqu'elle permet une détection de l'ordre du nanomolaire (nM). La gamme étalon de 0 à 1  $\mu\text{M}$  nous informe que la saturation intervient dès 400 nM (Figure 37D). Notons qu'une superposition des graphiques a été réalisée pour comparer l'affinité de H4 ciblant le lysozyme à l'affinité de D1 et C3 ciblant la Tegeline. Nous avons également réalisé une variante de cette méthode en fixant directement les affitines sur la plaque. Des résultats similaires ont été obtenus avec une limite de quantification de 25 nM pour C3 et D1 et 200

nM pour H4 (Figure 37E). Dans cette variante, l'anticorps couplé à l'HRP utilisé pour la détection se fixe directement sur les étiquettes His-tag des affitines. Il semble que H4 soit moins bien détectée en comparaison de C3 et D1.

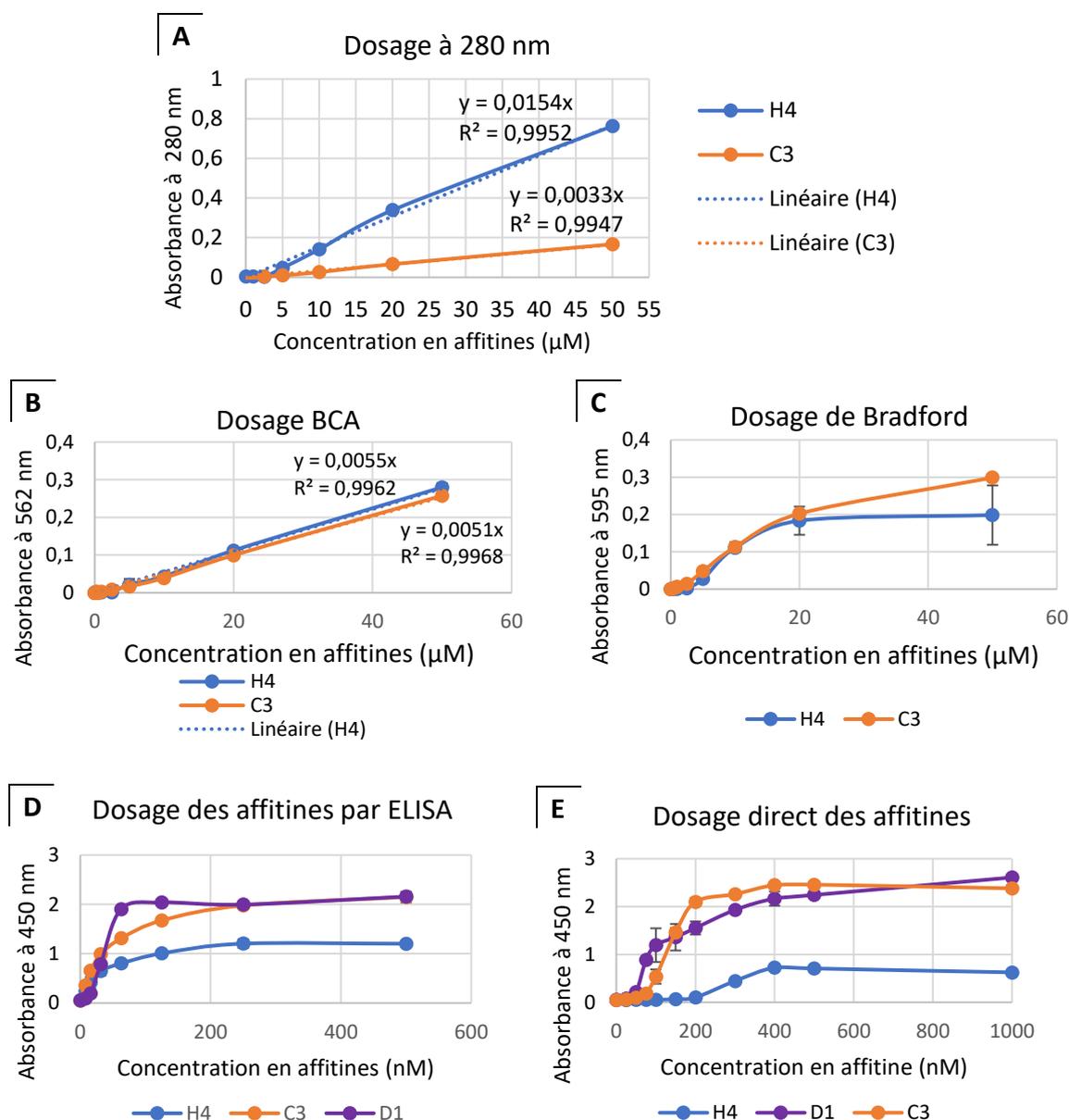


Figure 37. Méthode de quantification basée sur la spectrophotométrie

**A)** Dosage direct des résidus aromatiques. Lecture à 280 nm. **B)** Dosage colorimétrique BCA basé sur le changement de couleur de l'acide bicinchoninique avec les ions cuivres Cu(I) et Cu(II). Lecture à 562 nm. **C)** Dosage colorimétrique de Bradford basé sur le changement de la couleur du bleu de Coomassie après liaison avec les AA basiques et les résidus hydrophobes. Lecture à 595 nm. **D)** Dosage ELISA. Les cibles sont fixées sur la plaque, H4 se lie au lysozyme tandis que C3 et D1 se lient à la Tegeline. Lecture à 450 nm. **E)** Dosage direct. Les affitines sont fixées sur la plaque et l'anticorps anti-RGS-6His couplé à la HRP reconnaît les affitines. Lecture à 450 nm. Les résultats sont exprimés en moyenne et écart-type de 3 réplicats techniques.

Les affinités H4, C3 et D1 possèdent dans leur séquence protéique une ou plusieurs Lysines dont la fonction NH<sub>2</sub> peut se lier à la molécule d'AlexaFluor NHS Ester. L'affinité D1 possède de surcroît une cystéine à quelques AA en C-terminale, ce qui nous permet d'ajouter un fluorophore sur son unique fonction thiol, avec la molécule AlexaFluor Maléimide. Un dosage par détection de la fluorescence émise par les deux types d'Alexa a été réalisé avec une gamme de 0 à 500 nM (Figure 38A).

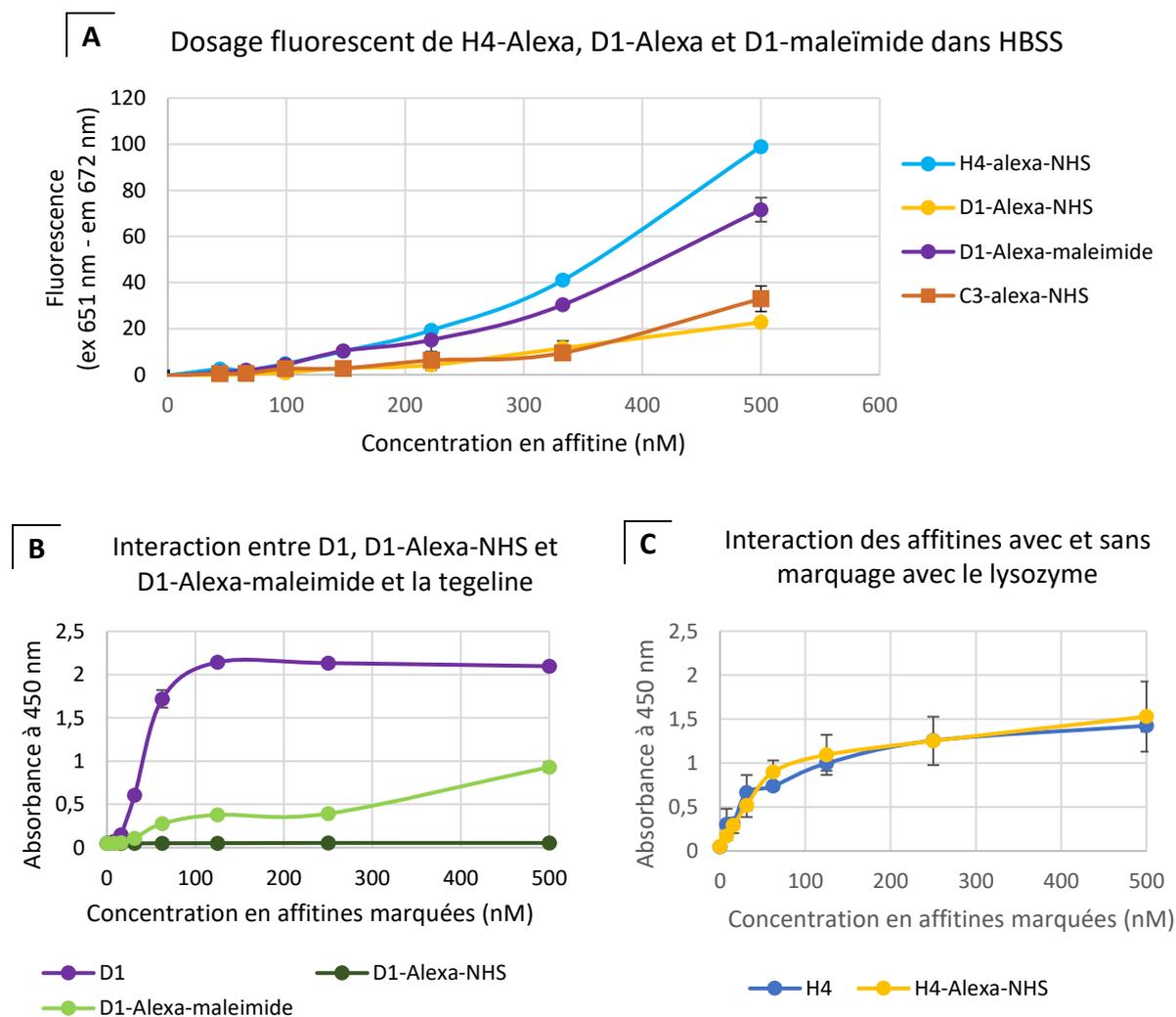


Figure 38. Méthodes de dosage basées sur la fluorimétrie

**A)** Dosage de la fluorescence émise par un marquage à l'Alexa-NHS et l'Alexa-maléimide dans l'HBSS. L'intensité de fluorescence émise est mesurée à la longueur d'onde 672 nm d'excitation (em) après une excitation à 651 nm (ex). **B)** Dosage ELISA de D1 marquée à l'Alexa-NHS, l'Alexa-maléimide et sans marquage. **C)** Dosage ELISA de H4 marquée à l'Alexa-NHS et sans marquage. Les résultats sont exprimés en moyenne et écart-type de 3 réplicats techniques.

Les résultats montrent des valeurs de fluorescence reproductibles au-dessus de 40 nM, ce qui signifie qu'en dessous de cette valeur, nous sommes dans la limite de détection. Une droite linéaire est obtenue pour une gamme restreinte (0 et 300 nM) pour les 3 affitines marquées à l'Alexa-NHS tandis que la linéarité est conservée pour l'ensemble de la gamme avec l'Alexa-maléimide. Il est à noter que le degré de marquage ou DOL (Degree Of Labeling) fluctue d'un marquage à l'autre. Aussi plus le DOL est important, plus l'intensité de fluorescence le sera également. Les résultats ne sont pas montrés ici, mais le DOL concernant H4-Alexa-NHS est plus important que celui de D1 par exemple, ce qui explique la différence d'intensité de fluorescence observée sur le graphique.

Le marquage des affitines constitue une étape de pré-traitement des échantillons, ce qui peut avoir des conséquences sur la fonction de la protéine et son affinité pour la cible. En effet, nous avons observé que D1 non marquée avait une meilleure interaction avec la Tegeline (Figure 38B) alors que pour H4, nous ne constatons pas de différence (Figure 38C). La molécule ajoutée lors du marquage modifie également les interactions avec la cible puisque la molécule Alexa-NHS fait perdre toute activité de liaison à D1 contrairement à l'Alexa-maléimide. Les écarts de marquage d'une expérience à l'autre ne nous permettent pas de retenir cette méthode.

La méthode de Western-blot classiquement utilisée pour identifier une protéine dans un échantillon contenant un mélange de protéines est également une méthode de détection. C'est une technique couramment employée en laboratoire dont les résultats permettent de déterminer le poids moléculaire et la quantité relative d'une protéine grâce à un anticorps spécifique utilisé pour la détection. Les affitines possèdent toutes une queue poly-histidine reconnue par un anticorps anti-RGS-6His. Nous avons validé une gamme étalon pour chaque affitine (10, 20, 40 et 60 ng), ce qui nous a permis grâce au logiciel Image-Lab de déterminer visuellement un échantillon de concentration inconnue par comparaison à la gamme. Le résultat des gammes pour chaque affitine est présenté en Figure 39. La détection en western-blot est donc possible avec 10 ng, soit 1 pmol de protéine. Cette technique est la plus appropriée pour discriminer la présence ou non de l'affitine, toutefois il s'agit d'une méthode semi-quantitative.

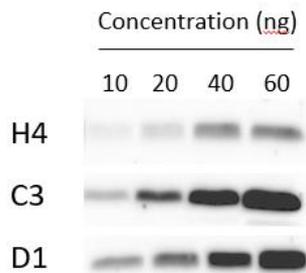


Figure 39. Méthode de suivi des affitines par western-blot.

Gamme de concentrations en affitines H4, D1 et C3 (10-20-40 et 60 ng) visualisée par western-blot en condition liquide. La détection est réalisée avec un anticorps ciblant l'étiquette His-tag des affitines.

### 1.2.2. Evaluation du transport des affitines sur la barrière intestinale

Avant d'évaluer la perméabilité membranaire intestinale des affitines H4, C3 et D1, nous avons cherché à valider leur innocuité pour les cellules intestinales en utilisant une lignée cellulaire Caco-2 comme modèle. Pour cela, nous avons incubé les trois affitines pendant 24 h sur des cellules Caco-2. La viabilité cellulaire a été déterminée par un test MTT qui témoigne de l'activité mitochondriale. Une gamme de DMSO a été utilisée comme témoin de cytotoxicité. Par comparaison au DMSO, l'affitine H4 n'induit aucune cytotoxicité (Figure 40A).

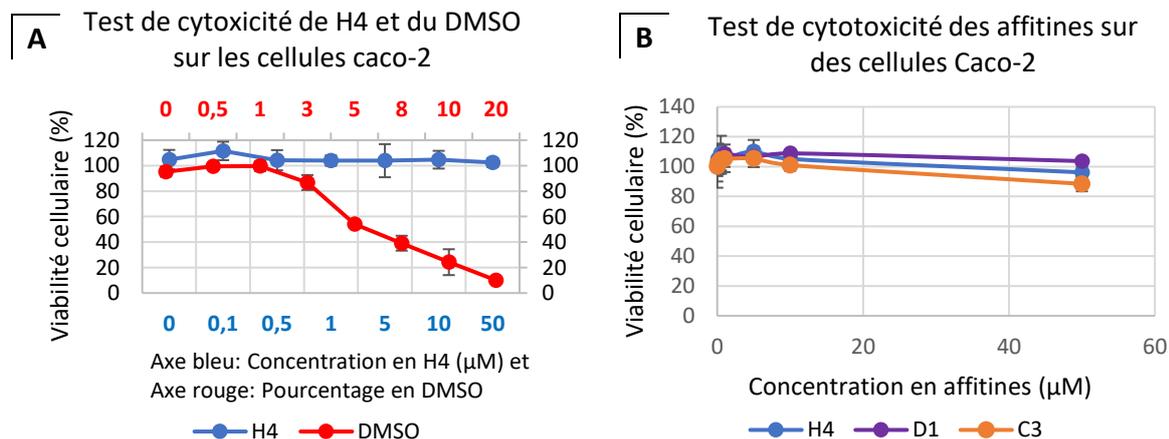
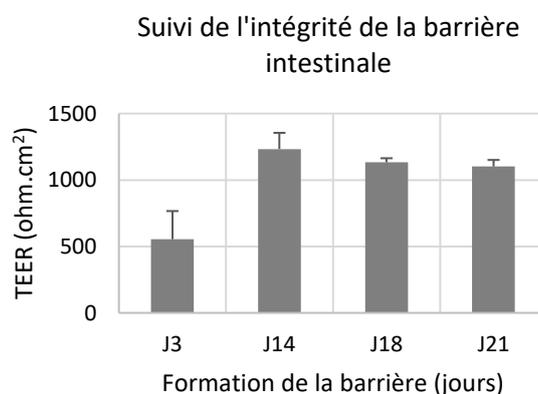


Figure 40. Validation de l'innocuité des affitines H4, D1 et C3 pour les cellules intestinales

Test de viabilité par MTT sur les cellules Caco-2. **A**) Gamme de DMSO (0 à 20 %) représentant le témoin de cytotoxicité comparé à une gamme en H4 de 0 à 50 μM. **B**) Gamme de concentrations en H4, C3 et D1 de 0 à 50 μM. Les résultats sont exprimés en moyenne et écart-type de 3 réplicats biologiques.

Les valeurs de viabilité cellulaire sont supérieures ou égales à 90 % pour les 3 affitines donc elles sont considérées comme n'entraînant pas d'effet cytotoxique sur les cellules (Figure 40B). De plus, nous constatons à la suite d'un comptage cellulaire que les 3 affitines ne diminuent pas non plus la croissance cellulaire. Nous pouvons donc continuer nos expériences et évaluer l'effet sur le passage des affitines à travers une monocouche de Caco-2 cultivée sur des filtres Transwell.

La reproduction d'un modèle de perméabilité intestinale impose de former une barrière avec des jonctions cellulaires matures. Aussi, pour s'assurer de la bonne constitution de la barrière, nous avons suivi la résistance transépithéliale (TEER) des monocouches de cellules Caco-2 sur les inserts Transwell. La figure 41 montre la diminution de la perméabilité entre le jour 3 et le jour 14 puis la stabilisation des valeurs de TEER exprimées en  $\text{ohm.cm}^2$  entre la 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> semaine de culture. La faible valeur du TEER au 3<sup>ème</sup> jour après ensemencement traduit bien l'état de la barrière puisqu'à ce stade, toutes les protéines de jonction ne se sont pas encore formées.

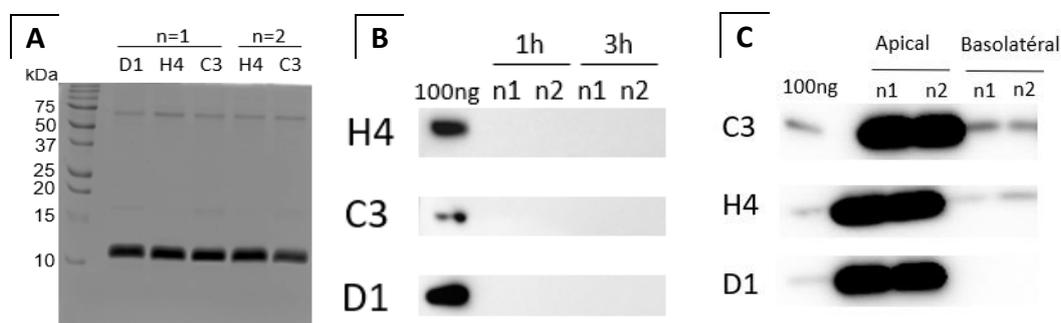


**Figure 41.** Evaluation de la perméabilité membranaire par mesure du TEER

Mesure du TEER au cours de la formation de la barrière intestinale sur 21 jours. Les résultats sont exprimés en moyenne et écart-type de 12 réplicats biologiques.

Une fois la monocouche constituée, nous avons incubé les affitines dans un tampon HBSS dans la chambre apicale des inserts durant 24 h. Après vérification de la présence des affitines dans le compartiment apical avec une électrophorèse sur gel SDS-PAGE (Figure 42A), nous avons réalisé une étude cinétique du compartiment basolatéral. La détection par Western-blot a révélé qu'entre 20 min et 5 h, aucune des trois affitines n'a traversé la monocouche de

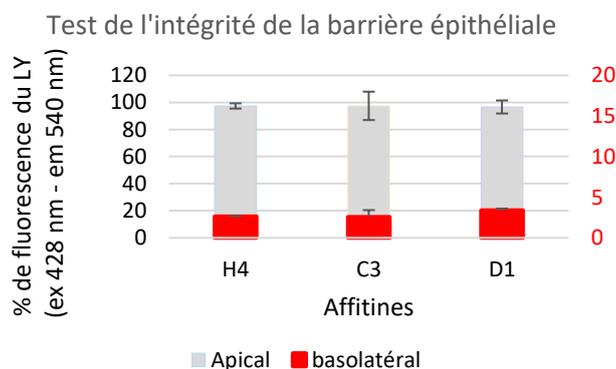
cellules (Figure 42B). En revanche, à l'issue de 24 h d'incubation, une très faible part de ces affitines, correspondant à moins de 100 ng, a pu être visualisée par Western-blot pour H4 et C3. D1 dans son cas ne traverse pas la barrière même après 24 h (Figure 42C).



**Figure 42.** Suivi des affitines au travers d'une monocouche épithéliale différenciée de Caco-2

**A)** Vérification de la présence des affitines dans la chambre apicale par électrophorèse SDS-PAGE. **B)** Détection par Western-blot des affitines dans le compartiment basolatéral d'un insert Transwell à 1 h et 3 h d'incubation. **C)** Détection par Western-blot des affitines dans le compartiment apical et basolatéral après 24 h d'incubation. Dépôt de 2 réplicats biologiques (n1 et n2) et d'un témoin à 100 ng.

Afin de comprendre pourquoi une faible part des affitines H4 et C3 sont retrouvées dans le compartiment basolatérale, nous avons ajouté dans la chambre apicale avec les affitines une solution de Lucifer Yellow (LY) connue pour ne pas traverser la barrière lorsque cette dernière ne subit pas de dommage. Les résultats du dosage de la fluorescence montrent qu'un très faible pourcentage en LY, inférieur à 5 %, a pu être détecté à 3 h dans le compartiment basolatéral (Figure 43).



**Figure 43.** Evaluation de la perméabilité membranaire après exposition aux affitines

Mesure de la fluorescence émise par la Lucifer Yellow après 3 h d'incubation des affitines H4, C3 et D1 à 0,5  $\mu$ M dans le compartiment apical. Les résultats sont exprimés en moyenne et écart-type de 3 réplicats biologiques.

De plus, nous retrouvons bien  $92 \pm 8$  % de la fluorescence dans le compartiment apical, ce qui confirme que la monocouche de Caco-2 n'a pas été endommagée pendant les expériences de transport des affitines H4, C3 et D1. En revanche, il est à noter qu'à 24 h, une proportion plus importante de LY est détectée dans le compartiment basolatéral (environ 20 %), suggérant une légère perturbation de l'intégrité de la monocouche et pouvant expliquer la faible quantité d'affitines détectées dans la chambre basolatérale après 24 h d'incubation (Figure 42C). Nous pouvons ainsi conclure que les affitines n'induisent pas de détérioration de la barrière et qu'elles ne traversent pas non plus la barrière. Leur utilisation pour une action au niveau du tractus digestif est donc possible.

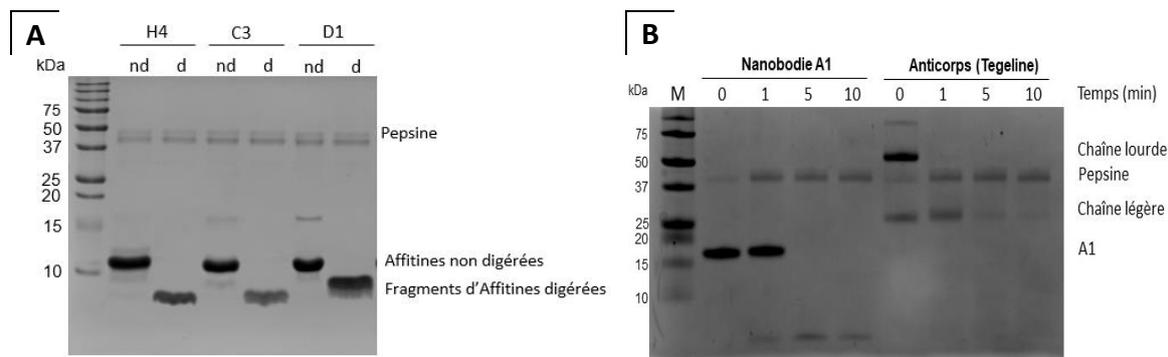
### 1.2.3. Comportement des affitines dans un milieu synthétique gastrique et intestinal

Lors du passage gastro-intestinal, les protéines vont subir un ensemble de contraintes physico-chimiques comme le pH, la composition en soluté et les activités enzymatiques comme l'action des protéases telles que la pepsine dans l'estomac et la trypsine/chymotrypsine dans l'intestin. Cette variation des conditions entre l'estomac et l'intestin est reproduite à l'aide de milieux synthétiques mis au point au laboratoire.

Les résultats de la digestion des affitines ont pu être analysés grâce à un gel électrophorèse en condition dénaturante. Lorsque l'on place H4, C3 et D1 dans le milieu synthétique gastrique, nous observons une digestion partielle (Figure 44A). En effet, la bande à 10 kDa correspondant à l'affitine dans le milieu synthétique avec l'enzyme inactivé n'est plus retrouvée lorsque la pepsine est active. A la place, nous avons une bande de poids moléculaire inférieur. D1 présente une bande de digestion de taille légèrement plus élevée que H4 et C3. Une plus petite bande d'environ 15 kDa est constatée au-dessus des témoins non digérés, elle peut correspondre à un dimère de l'affitine.

Lorsque l'on compare le comportement des affitines face à la digestion gastrique à celui d'un nanobody et d'un anticorps, il semble que les affitines soient plus résistantes dans le temps. Le Nanobody A1 est digéré totalement à partir de 5 min d'incubation. La Tegeline voit sa chaîne lourde digérée totalement dès 1 minute contrairement à la chaîne légère qui est digérée après 5 min. Dans le cas d'une administration orale, ces deux protéines ne peuvent donc plus agir sur leur cible puisqu'aucun fragment n'est visible après 10 min (Figure 44B) contrairement aux affitines qui présentent un fragment après 15 min d'incubation. A ce stade,

nous nous sommes questionnés sur la résistance des affitines dans le temps et de l'effet de la concentration en pepsine sur la fragmentation.

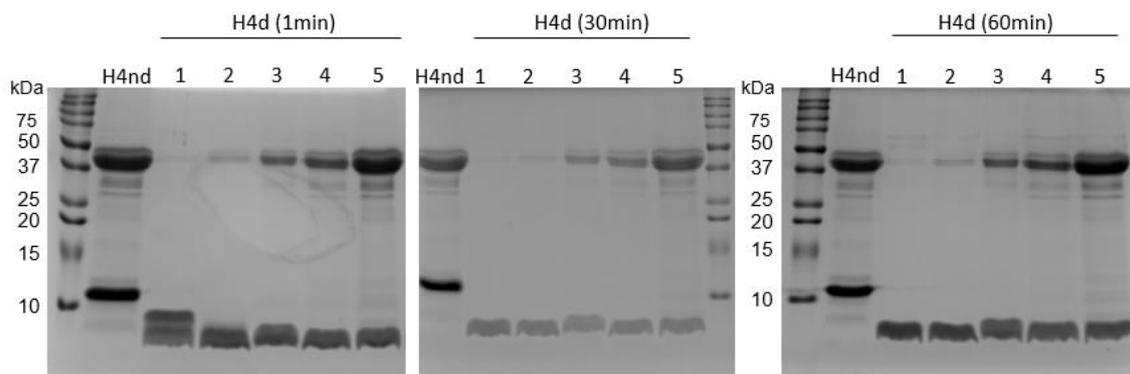


**Figure 44.** Digestion des affitines, d'un nanobodie et d'un anticorps dans un milieu synthétique gastrique

**A)** Digestion de H4, D1 et C3 avec la pepsine à 0,1 mg/mL après 15 min d'incubation. Les affitines non digérées (nd) servent de témoin, elles sont incubées dans le milieu synthétique, mais avec une pepsine qui a été inactivée. La réaction des affitines digérées (d) est stoppée par ajout de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . **B)** Comparaison de la résistance à la digestion gastrique du nanobodie A1 et de l'anticorps Tegeline avec 0.1 mg/mL de pepsine.

Nous ne nous attendions pas à avoir une résistance à la digestion puisque les séquences en affitines sont riches en résidus aromatiques. Aussi, nous avons été surpris de constater que la concentration en pepsine avait peu d'impact sur la fragmentation des affitines. Que l'on se place à une faible concentration en pepsine (0.025 mg/mL) ou bien à forte concentration (3.2 mg/mL), la fragmentation donne lieu à la même bande de digestion, une bande inférieure à 10 kDa. Par contre si l'on observe l'intensité de la bande correspondant à la pepsine, celle-ci augmente proportionnellement à la concentration (Figure 45). De plus, les fragments restent stables au cours du temps, des expériences supplémentaires ont démontré leur stabilité sur plus de 24 h d'incubation. Afin d'écartier le biais lié à l'activité de la pepsine, des tests complémentaires ont permis de déterminer la durée de conservation du milieu de digestion contenant l'enzyme. La pepsine reste stable et active sur plus d'une 1 semaine lorsqu'elle est conservée à  $-20^\circ\text{C}$  donc la stabilité des fragments n'est pas liée à une inaction de l'enzyme.

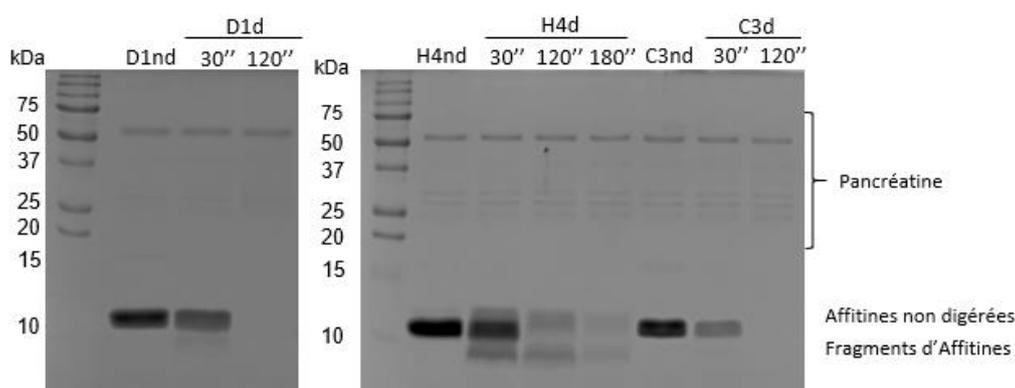
Nous pouvons noter qu'en nous plaçant dans la condition la moins contraignante, soit 1 min d'incubation avec la plus faible concentration en pepsine, nous observons deux bandes de poids moléculaires inférieures à 10 kDa ce qui traduit d'une digestion progressive, mais très rapide de la chaîne polypeptidique de H4 (Figure 45).



**Figure 45.** Résistance à la digestion gastrique de H4

Effet de la concentration en pepsine (condition 1 : 0,025 mg/mL ; condition 2 : 0,1 mg/mL ; condition 3 : 0,5 mg/mL ; condition 4 : 1 mg/mL ; condition 5 : 3,2 mg/mL) et stabilité de H4 à 0,5 mg/mL dans le temps (1, 30 et 60 min).

Les résultats sont plus tranchés lors des digestions dans un milieu mimant le compartiment intestinal en présence de pancréatine (obtenue à partir de suc pancréatique lyophilisé). En effet, nous pouvons voir sur la figure 46 que D1 et C3 disparaissent du gel après 2 min d'incubation. Pour H4, deux bandes de poids moléculaires inférieures à 10 kDa sont visibles dans les 2 premières min d'incubation puis disparaissent à leur tour (Figure 46). Les contrôles en affitine non digérée valident la méthode d'arrêt de la réaction enzymatique. Nous pouvons donc exclure une action pancréatique plus longue qu'attendue. Les affitines ne sont donc pas capables de traverser l'intestin sans être totalement digérées.



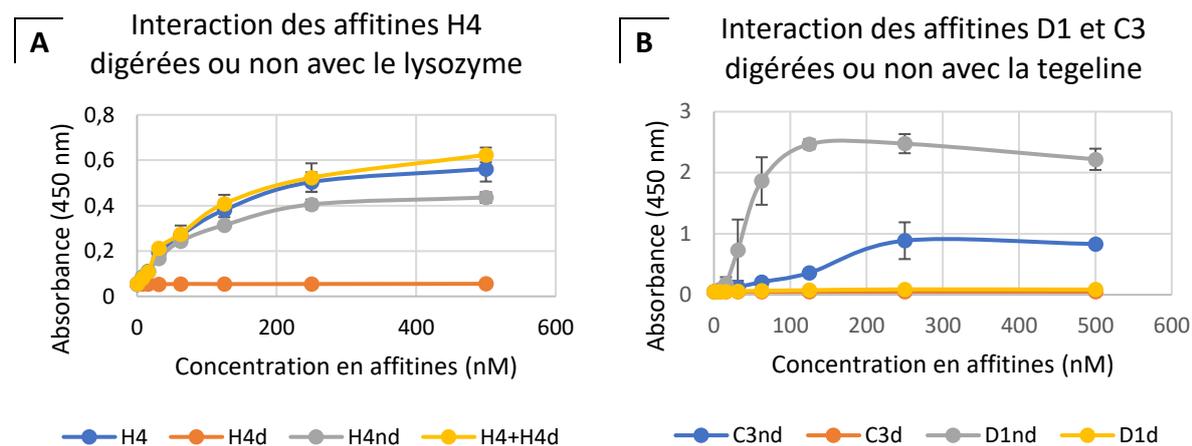
**Figure 46.** Digestion des affitines dans un milieu synthétique intestinal

Digestion de H4, D1 et C3 à 0,5 mg/mL avec la pancréatine à 1 mg/mL à différents temps d'incubation (30, 120 et 180 secondes). Les affitines non digérées (nd) servent de témoin, elles sont incubées dans le milieu synthétique, mais avec une pancréatine qui a été inactivée. La réaction des affitines digérées (d) est stoppée par dénaturation à 100 °C.

Contrairement à la digestion intestinale, les affinités dans un milieu gastrique présentent une digestion stable dans le temps sans disparition des fragments. La pepsine agit sur des AA spécifiques, ce qui entraîne un clivage partiel. Nous avons tenu à déterminer si le fragment observé après digestion pouvait garder une activité de ciblage. Pour cela, des extraits digérés ont été analysés par ELISA.

Dans un premier temps, nous avons souhaité valider notre contrôle en comparant H4 n'ayant pas été soumise au milieu synthétique gastrique et H4 non digérée (H4nd) qui correspond au milieu synthétique avec la pepsine inactivée. Dans ces deux conditions, nous avons une bonne affinité pour la cible avec néanmoins une légère diminution de la fixation qui peut être liée à la solution synthétique qui interfère légèrement avec la cible. Pour H4 digérée (H4d) dans le milieu synthétique gastrique, nous remarquons que le fragment perd son affinité pour le lysozyme (Figure 47A). Cette perte d'interaction pourrait être due à une perte de la séquence RGS-6His utilisée pour la détection de l'interaction.

En effet, la détection de l'affinité est permise par l'anticorps anti-RGS-6His, donc en absence de queue poly-His sur le fragment de digestion, nous ne pouvons pas détecter une potentielle interaction avec la cible. Afin de répondre à cette question, nous avons réalisé un ELISA par compétition entre H4 et H4d pour évaluer si la présence du fragment après digestion perturbe l'interaction de H4 avec la cible. Nous observons une interaction similaire de H4 avec le lysozyme même en présence de 250 nM du fragment H4d. En effet, les valeurs d'intensités d'absorbance pour H4 et H4+H4d sont identiques, il n'y a donc pas de diminution de l'interaction indiquant que seule H4 se fixe. Le fragment digéré de H4 n'interfère donc pas sur l'interaction, suggérant qu'il n'interagit pas avec le lysozyme et qu'il a perdu son affinité. Concernant les protéines C3 et D1, les fragments perdent également leur affinité pour leur cible la tegeline (Figure 47B).



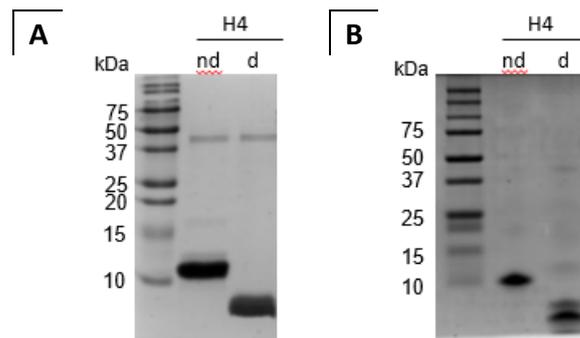
**Figure 47.** Interaction des affitines digérées et non digérées avec leur cible

**A)** Dosage ELISA de H4 dans différentes conditions. H4 dans H<sub>2</sub>O, H4nd dans le milieu synthétique gastrique avec la pepsine inactivée, H4d dans le milieu synthétique gastrique. **B)** Dosage ELISA de C3 et D1 digérées dans le milieu synthétique gastrique et non digérées dans le milieu synthétique gastrique avec l'enzyme inactivée. Les résultats sont exprimés en moyenne et écart-type de 3 réplicats techniques.

Afin de vérifier la présence ou non de la queue poly-His sur les fragments des protéines digérées, nous avons réalisé un western-blot. Après révélation, les fragments de H4 et C3 digérées sont détectés, mais en plus faible intensité que les protéines non digérées. Pour expliquer cette différence, nous pouvons supposer que la superposition de plusieurs fragments peut entraîner une gêne de la reconnaissance de la queue poly-His par les anticorps entraînant une diminution du signal.

Dans le cas où nous aurions plusieurs fragments stables, la résolution de nos gels SDS-PAGE ne permet pas de distinguer plusieurs fragments de poids moléculaire inférieur à 10 kDa. Nous avons donc entrepris de réaliser des gels plus résolutifs en modifiant de nombreux paramètres tels que le pourcentage du gel, le tampon Tris-HCl, la concentration en urée, glycérol ou glutaraldéhyde (l'ensemble des paramètres testés a été décrit dans la partie matériels et méthodes).

Par cette optimisation du gel, nous avons pu confirmer notre hypothèse selon laquelle plusieurs fragments stables sont générés lors de la digestion gastrique (Figure 48B). En effet, nous observons trois bandes inférieures à 10 kDa sur le gel optimisé alors que nous n'en obtenions qu'une avec un gel conventionnel (Figure 48A).



**Figure 48.** Optimisation du gel de séparation SDS-PAGE

Digestion de H4 à 0,5 mg/mL avec la pepsine à 0,1 mg/mL après 15min d'incubation. Les affitines non digérées (nd) servent de témoin, elles sont incubées dans le milieu synthétique, mais avec une pepsine qui a été inactivée. La réaction des affitines digérées (d) est stoppée par ajout de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . **A)** Gel SDS-PAGE conventionnel **B)** Gel SDS-PAGE optimisé.

### 1.3. Discussion

Avec ce travail, nous avons montré que les affitines pouvaient présenter un intérêt comme vecteurs thérapeutiques ou diagnostics alternatifs aux anticorps. L'affitine H4, qui cible le lysozyme, est une candidate potentielle comme vecteur thérapeutique. Le lysozyme est sécrété par les granulocytes, les monocytes et les macrophages et possède des propriétés antibactériennes et inflammatoires (Shimazaki et Takahashi 2018; Sherly Carolyn et al. 2019). Dans le cas de la maladie de Crohn, la surproduction de lysozyme est le résultat d'une réaction anormale du système immunitaire. La destruction de bactéries commensales symbiotiques par l'action du lysozyme pourrait être une cause du manque de modulation inflammatoire et immunitaire de l'intestin (Rubio 2015). L'utilisation des affitines à des fins cliniques en tant qu'outils thérapeutiques exige de maîtriser leur comportement dans des conditions physiologiques. L'appréciation de ce comportement est d'autant plus importante lorsque la protéine est destinée à être administrée par voie orale.

Nous avons démontré que l'affitine H4 ainsi que deux autres affitines (D1 et C3) de la même famille Sac7d ne présentaient pas de toxicité pour les cellules épithéliales intestinales humaines. Elles n'endommagent pas non plus la barrière intestinale et ne la traversent pas. Par conséquent, leur innocuité leur permet de circuler dans le tractus digestif pour rejoindre leurs cibles lorsque cette dernière est dans le système digestif. En revanche, si la cible est accessible après un passage systémique, dans ce cas les affitines ne pourront pas la rejoindre.

Le faible pourcentage en LY et en affitine retrouvé à 24 h dans le compartiment basolatéral lors des expériences de perméabilité peut s'expliquer par l'utilisation du tampon HBSS. En effet, l'HBSS n'est pas le milieu de croissance optimal pour les cellules et par conséquent après 24 h d'incubation dans ce milieu, les cellules peuvent en être légèrement affectées. Néanmoins, suite à différents essais, le tampon HBSS était le plus adapté aux méthodes de détection nécessaires à nos expériences. C'est également le tampon indiqué dans de nombreuses études de perméabilité intestinale dans la littérature (Angelis et Turco 2011; Hubatsch, Ragnarsson, et Artursson 2007).

Un nombre important de méthodes de dosage ont été développées pour détecter les protéines dans un mélange à des concentrations faibles. D'ordinaire les méthodes spectrophotométriques, reposant sur l'émission à 280 nm des AA aromatiques, suffisent pour la quantification de l'ordre du micromolaire. Nos résultats de dosages à 280 nm de H4 et C3 s'expliquent parce que la protéine H4 présente plus de tryptophanes (2 Trp) et de tyrosines (2 Tyr) que la protéine C3 (0 Trp et 2 Tyr), c'est pourquoi l'intensité de détection de H4 à 280 nm est plus importante par rapport à la protéine C3. Les méthodes de dosages colorimétriques que nous avons testées telles que Bradford et BCA n'offrent pas de gains de sensibilité et sont plus longues à mettre en œuvre, c'est pourquoi nous les avons écartées pour l'étude de la perméabilité intestinale. Nous confirmons ce qu'indiquent De Mey et al. : la quantification par UV280 donne les meilleurs résultats que des méthodes spectrophotométriques (De Mey et al. 2008). Néanmoins, pour réaliser une détermination précise de la concentration, cette méthode nécessite de connaître la composition en AA de la protéine.

Les tests immunologiques liés à une enzyme présentent l'avantage d'éviter les problèmes de contamination croisée avec d'autres fractions protéiques. Cette méthode nous permet, par la même occasion, de contourner la nécessité d'utiliser des protéines de références pour calculer les quantités de protéines contrairement aux méthodes colorimétriques. Comme nous l'indiquent nos résultats, ce mode de détection est plus sensible avec une détection des affitines de l'ordre du nanomolaire. Sur la base de ces connaissances, nous avons mis en place un ELISA direct des affitines en profitant de leur queue poly-His comme moyen de détection. Comme l'explique Lin, cette méthode implique un seul anticorps, il n'y a pas de réactivité croisée avec les anticorps secondaires (Lin 2015). Cette méthode, bien que sensible, a le défaut d'entraîner des extinctions de signal lorsque nos affitines sont dans le milieu HBSS qui

rappelons-le, est la condition des études de perméabilité retenue. C'est pourquoi nous avons cherché à greffer un fluorophore "extrinsèque" sur les affitines H4, C3 et D1.

La plupart des fluorophores peuvent être attachés par fixation covalente sur un groupe fonctionnel spécifique aux protéines, par exemple, sur le groupe -SH des résidus de cystéine ou le groupe -NH<sub>2</sub> des résidus de lysine. Notre marquage à l'AlexaFluor647-NHS et AlexaFluor647-maléimide a permis d'augmenter le signal de détection dans le milieu HBSS. D'après Modesti et al., il est courant de remarquer que les protéines forment des agrégats après le marquage (Modesti 2011). Le marquage peut aussi conduire à des effets non favorables comme la perte de ciblage. Les travaux d'Edelman et Hauri sur le marquage d'IgG concluent que « non seulement le DOL des IgG modifiées peut entraîner un changement des propriétés des protéines, mais le type de marquage peut également le faire » (Edelmann et Hauri 2021). Partant de ces constats, nous avons étudié l'impact du marquage sur la fonction de ciblage des affitines labélisées à l'AlexaFluor par ELISA conventionnel. Une différence de comportement a été mise en évidence entre les affitines H4 et D1 marquées. Le marquage à l'Alexa n'induit aucune perte d'affinité pour H4-Alexa-NHS alors que cela n'est pas le cas pour D1-Alexa-NHS et D1-Alexa-maléimide.

Le Western-blot est une méthode de chimioluminescence en plusieurs étapes qui permet la détection et la quantification dans une certaine mesure des protéines issues d'un mélange complexe. Les caractéristiques de précision et de reproductibilité lui font parfois défaut indiquent Taylor et al. (Taylor et al. 2013). Pourtant, nous avons obtenu la meilleure sensibilité (40 nM) et il est en adéquation avec un dosage en milieu HBSS. Il s'agit de la technique que nous avons retenue pour la détection des affitines dans un contexte de perméabilité cellulaire.

Une autre méthode de dosage possible est d'utiliser la spectrométrie de masse, l'une des principales méthodes d'analyse quantitative des protéines (Van de Merbel 2019). Bien qu'elle soit particulièrement sensible et permette la détection simultanée d'un mélange de protéines, la spectrométrie de masse est une méthode coûteuse qui ne possède pas de système polyvalent. Ainsi la chaîne analytique varie en fonction de la protéine (Ingrand 2012). L'accès à une plateforme offre l'avantage de disposer d'un équipement adapté, néanmoins l'analyse des affitines étant peu courante, il n'existe pas de standard interne préconçu. Un important effort devrait être mené dans les étapes d'optimisation pour quantifier les affitines.

L'intestin est une cible importante de la toxicité induite par les médicaments. De ce fait, la prédiction des effets secondaires intestinaux est un problème qui doit être évalué dans le développement pharmaceutique. Bien que l'expérimentation soit utile pour répondre à ce défi, les différences entre espèces et la réduction de l'utilisation des animaux justifient de se tourner vers les modèles *in vitro*. Le modèle de lignée cellulaire Caco-2 a fait la preuve de son efficacité pour l'évaluation de la perméabilité et de toxicité avec la reproduction des entérocytes polarisés et des villosités qui se forment en apical quand les Caco-2 sont placées dans un système Transwell. Avec ce modèle, aucune toxicité des affitines n'a été relevée à une faible ou forte concentration. Ces cellules peuvent aussi exprimer des éléments impliqués dans l'élimination des médicaments comme des niveaux élevés d'enzymes et de transporteurs. Cependant, elles ne peuvent pas reproduire la variabilité inhérente aux différents segments de l'intestin. Un modèle plus complexe comme le système PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) ou le PCIS (The precision-cut intestinal slice) pourrait compléter les études de toxicité et renforcer nos conclusions (Niu, de Graaf, et Groothuis 2013) (Reis, Sinkó, et Serra 2010).

Nous avons évalué la stabilité des affitines, dans des fluides gastriques (FaSSGF) et intestinaux (FaSSIF) simulés, sur la base de la composition détaillée par Biorelevant.com. L'ajout d'enzymes à l'action de clivage spécifique aux protéines nous a permis de nous placer dans des conditions mimétiques proches des conditions physiologiques.

Dans les conditions de digestions énoncées, l'affitine H4 montre qu'elle est fortement dégradée dans un milieu intestinal riche en trypsine alors qu'elle possède des fragments stables dans le milieu gastrique riche en pepsine. Dans les mêmes conditions simulées, des fragments stables similaires ont été obtenus avec les autres affitines que nous avons testées (C3 et D1), alors qu'une disparition totale des protéines a été observée avec d'autres protéines vectrices, telles qu'un nanobody et un anticorps. La dégradation des chaînes lourdes et légères des IgG a été de nombreuses fois décrite (Jasion et Burnett 2015). En raison de cette digestion, il est difficile d'administrer oralement des IgG. La littérature fait état d'une fonctionnalité réduite à 25 % ou au mieux 70 % tout au long du tractus gastro-intestinal (Handen et al. 2009 ; Jasion et Burnett 2015). Nos résultats de digestion confirment une nouvelle fois la stabilité particulièrement élevée des affitines dans des conditions extrêmes de pH (pH 1,6) et de façon nouvelle en présence de pepsine.

Au-delà de l'aspect de résistance aux conditions sévères du milieu gastrique et intestinal, on s'attend à ce que ces protéines puissent produire des médicaments sûrs et possédant une efficacité thérapeutique. Il semble important de discuter nos résultats d'affinité des fragments de digestion pour la cible. Nous avons mis en évidence qu'il y avait un fragment, issu de la digestion, qui gardait la queue poly-his mais qui perdait toute affinité pour la cible. Avec l'optimisation du gel SDS-Page que nous avons faite et qui ajoute principalement de l'urée et du glycérol, nous avons identifié trois fragments de digestion. Néanmoins, nous ne pouvons identifier lequel est porteur de la queue poly-his. Les expériences de compétition pour la cible entre les fragments et la protéine non digérée n'ont pas montré de perte d'affinité, indiquant indirectement qu'aucun fragment ne présente d'interaction avec la cible, ou bien une interaction, mais trop peu affine pour être compétitrice. Nous émettons l'hypothèse qu'une coupure affecte le site de reconnaissance impliqué pour l'interaction avec la cible.

La digestion des affitines a donc généré de petits fragments qui n'interagissent plus avec leur cible, empêchant l'administration orale des affitines dans un but thérapeutique. Afin de se soustraire aux digestions gastriques et intestinales, le développement d'une formulation pharmacologique adaptée permettrait de conduire l'affitine vers sa cible *in vivo* sans qu'elle soit absorbée par la barrière intestinale ou dégradée. L'utilisation de système d'encapsulation des affitines pourrait être une alternative ; plusieurs stratégies sont déjà employées pour l'administration de médicaments. Différentes nanoparticules ont ainsi été développées dans ce but. Les liposomes et leur structure en bicouche lipidique sont des supports biocompatibles pour améliorer la biodisponibilité orale des médicaments (Daeihamed et al. 2017). Les biopolymères tels que la nanocellulose bactérienne constituent un système unique, spécifique et qui ne présente pas de cytotoxicité (Fey et al. 2020 ; Kupnik et al. 2020). Récemment, des systèmes d'administration de nanomédicaments ciblant le côlon ont attiré l'attention dans les domaines de la maladie de Crohn ou des cancers colorectaux (Naeem et al. 2020). L'encapsulation de peptides et protéines ne représente pas la seule voie d'amélioration.

Le passage éventuel des affitines en études cliniques exige que les protéines présentent à la fois une grande affinité et une stabilité structurelle dans les conditions difficiles que constitue l'administration orale. Nous avons fait la preuve de l'innocuité des affitines pour la barrière intestinale, mais une résistance partielle à la digestion ne présente pas d'intérêt si les fragments stables n'interagissent plus avec leur cible. Il est accepté que des protéines

d'échafaudage, de plus petite taille et d'architecture plus simple que les IgG offrent une plasticité structurale suffisante pour être modifiées. La partie suivante du manuscrit répond à cet objectif et détaille les moyens mis en œuvre pour améliorer la résistance à la digestion gastrique et garder une affinité indispensable à l'efficacité thérapeutique.

## 2. Amélioration de la stabilité des affitines par ingénierie des protéines

### 2.1. Préambule

La voie conventionnelle pour l'administration des protéines et des peptides, dans le cadre d'une thérapie ou d'un diagnostic, est l'injection par voie intraveineuse. La courte demi-vie des protéines, les injections fréquentes, les concentrations fluctuantes des biomolécules dans le sang, ont poussé les chercheurs à trouver des solutions pour outrepasser la barrière gastro-intestinale et permettre la prise de médicament par voie orale.

Les protéines d'échafaudages telles que les affitines sont des polypeptides d'affinité artificiels issus de l'archéobactérie hyperthermophile *Sulfolobus acidocaldarius* découverte dans les années 1974 dans les geysers du Parc National de Yellowstone. Les affitines montrent une affinité et une spécificité comparables à celles des anticorps et offrent l'avantage d'une résistance aux pH et aux températures extrêmes. Du point de vue structural, les affitines sont capables d'inhiber des activités enzymatiques ouvrant la voie de ce fait à de potentielles applications biomédicales.

D'après nos travaux précédents, l'affitine H4 est digérée partiellement, donnant lieu à 3 fragments sans affinité pour le lysozyme. Il apparaît donc nécessaire de développer une protéine de ciblage capable de circuler dans le tractus digestif sans subir de modification pouvant porter atteinte à son intégrité et à sa fonction. Parmi les pistes de recherche visant à acquérir une résistance gastro-intestinale figure la modification de la séquence protéique par mutagenèse dirigée. Sur la base de cette idée, nous voulons identifier les résidus impliqués dans les sites de coupure, substituer ces résidus par d'autres, connus pour conserver les propriétés de conformation et d'activité, et vérifier la vulnérabilité des protéines mutées face à la digestion gastrique. En confrontant les mutants générés avec leur cible, nous espérons conserver la fonction de ciblage et augmenter les propriétés de résistance aux protéases. Nos expériences ont été menées avec l'affitine désignée H4.

## 2.2. Papier publié

www.nature.com/scientificreports

# scientific reports

 Check for updates

OPEN

## Characterization of Affitin proteolytic digestion in biorelevant media and improvement of their stabilities via protein engineering

Aurélien Loussouarn<sup>1</sup>, Ghislaine Béhar<sup>1</sup>, Frédéric Pecorari<sup>1,2</sup>, Mikael Croyal<sup>2,3</sup> & Axelle Renodon-Cornière<sup>1,2</sup>

Affitins are a novel class of small 7 kDa artificial proteins which can be used as antibody substitutes in therapeutic, diagnostic and biotechnological applications. One challenge for this type of protein agent is their behaviour in the context of oral administration. The digestive system is central, and biorelevant media have fast emerged as relevant and reliable tools for evaluating the bioavailability of drugs. This study describes, for the first time, the stability of Affitins under simulated gastric and intestinal digestion conditions. Affitins appear to be degraded into stable fragments in *in vitro* gastric medium. We identified cleavage sites generated by pepsin that were silenced by site-directed mutagenesis. This protein engineering allowed us to enhance Affitin properties. We showed that a mutant M1 containing a double mutation of amino acid residues 6 and 7 in H4 and C3 Affitins acquired a resistance against proteolytic digestion. In addition, these mutations were beneficial for target affinity, as well as for production yield. Finally, we found that the mutated residues kept or increased the important pH and temperature stabilities of Affitins. These improvements are particularly sought after in the development of engineered binding proteins for research tools, preclinical studies and clinical applications.

Proteins have become an important part of the pharmaceutical arsenal, with applications ranging from diagnosis to therapy<sup>1–3</sup>. However, the administration of proteins for therapeutic purposes is frequently limited to injectable routes, particularly due to their poor stability in the gastrointestinal tract. In addition to being sensitive to acidic environments related to gastrointestinal media, proteins are also degraded by the action of numerous proteolytic enzymes present in this environment.

The advantages of oral chemotherapy go beyond increased patient compliance, as flexibility of dosing schedule and cost reduction are additional benefits. However, the digestive tract does not differentiate between therapeutic and non-therapeutic proteins, which are both digested. Thus, the oral delivery of therapeutic protein drugs has always been a challenge and many efforts have been made to increase the proteolytic stability of these therapeutic agents<sup>4,5</sup>. One of the approaches is rational protein engineering in which defined mutations are inserted based on protein structure information and biochemical knowledge.

In that respect, elaborating *in vitro* biorelevant media that simulate human digestion has become increasingly important in nutritional and pharmaceutical research and development<sup>6–8</sup>. Such media should facilitate the prediction of food and drug behaviours in terms of solubility and stability, minimizing the need for animal and human testing.

Small (4–12 kDa) recombinant binder proteins have the potential to become a new class of therapeutic agents that bridge the gap between monoclonal antibodies and small molecule drugs<sup>1,16–15</sup>. Their clinical evaluations as antibody mimetics are ongoing. They have many advantages, such as selectivity, stability, and low production costs, whether from bacterial or chemical production. Of these binders, Affitins<sup>14</sup>, which are derived from the hyperthermostable Sac7d protein hosted by the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*, have been found of interest for therapeutic purposes<sup>15–17</sup> but also for biotechnological applications such as detection reagents<sup>17–18</sup> and affinity chromatography<sup>19</sup>. In previous works, a thermostable Affitin H4 (H4) directed against hen egg white lysozyme was identified<sup>20</sup> and used for different studies as proof of concept<sup>18,19,21</sup>.

<sup>1</sup>CRCINA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France. <sup>2</sup>NUN, INRA, CHU Nantes, UMR 1280, PhAN, IMAD, CRNH-O, 44000 Nantes, France. <sup>3</sup>CRNH-O Mass Spectrometry Core Facility, 44000 Nantes, France. ✉email: frederic.pecorari@univ-nantes.fr, axelle.renodon-corniere@univ-nantes.fr

Scientific Reports | (2020) 10:19703 | <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76855-z> nature research

## Introduction

Proteins have become an important part of the pharmaceutical arsenal, with applications ranging from diagnosis to therapy (Fani, Maecke, et Okarvi 2012; Walsh 2018; Leader, Baca, et Golan 2008). However, the administration of proteins for therapeutic purposes is frequently limited to injectable routes, in particular due to their poor stability in the gastrointestinal tract. Indeed, besides being sensitive to acidic environments related to gastrointestinal media, proteins are also degraded by the action of numerous proteolytic enzymes present in such environment.

The advantages of oral chemotherapy go beyond increased patient compliance as flexibility of dosing schedule and cost reduction are additional benefits. However, the digestive tract does not differentiate between therapeutic and non-therapeutic proteins that are both digested. Thus, the oral delivery of therapeutic protein drugs has ever since been a challenge and many efforts have been made to increase the proteolytic stability of these therapeutic agents (Jarchi, Ataei, et Hosseinkhani 2018; Kintzing, Filsinger Interrante, et Cochran 2016). One of the approaches is rational protein engineering in which defined mutations were inserted based on protein structure information and biochemical knowledges.

In that respect, elaboration of *in vitro* biorelevant media simulating human digestion has become increasingly important in nutritional and pharmaceutical research and development (Kaur, Narang, et Bansal 2018; Minekus et al. 2014; Korte, Bräcker, et Brockmeyer 2017; Roesler et Rao 2001). Such media should facilitate the prediction of food and drug behaviours in terms of solubility and stability, minimizing the need for animal and human testing.

Small (4–12 kDa) recombinant binder proteins have the potential to become a new class of therapeutic agents that bridge the gap between monoclonal antibodies and small molecule drugs (Weidle et al. 2013; Fani, Maecke, et Okarvi 2012; Simeon et Chen 2018; Škrlec, Štrukelj, et Berlec 2015; Gebauer et Skerra 2019). Their clinical evaluations as antibody mimetics are ongoing. They have many advantages such as selectivity, stability and low production cost whether from a bacterial or chemical production. Among these binders, Affitins (Mouratou et al. 2007), that are derived from the hyperthermostable Sac7d protein hosted by the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*, have been found of interest for therapeutic purposes (Vukojicic et al. 2019; Goux et al. 2017; Béhar et al. 2019) but also for biotechnological applications such as detection reagents (Béhar et al. 2019; Cinier et al. 2009; Miranda et al. 2011; Fernandes et al.

2016) and affinity chromatography (Béhar et al. 2016). In previous works, a thermostable Affitin H4 (H4) directed against hen egg white lysozyme was identified (Pecorari et Alzari 2008) and used for different studies as proof of concept (Cinier et al. 2009; Miranda et al. 2011; Correa et al. 2014).

To evaluate the bioavailability of Affitins in the context of an oral administration, we investigated here their stability by the use of simulated gastric and intestinal physiological *in vitro* conditions. Using these media, we observed stable digested fragments of H4 in gastric environment. After identification of the cleavage sites by mass spectrometry-based approaches, site-directed mutagenesis were performed in order to prevent the proteolytic degradation. Subsequently, the recombinant mutant proteins were purified and their biochemical properties were characterized and compared with the wild-type proteins.

Our study highlights that simulated gastrointestinal media could predict the oral digestion of therapeutic proteins. It also provides evidence that protein engineering at the identified cleavage sites, which common strategy is site-directed mutagenesis, represents an important tool to change protein properties and to improve proteolytic stability but also their efficacy, thermal stability and/or production level.

## **Results**

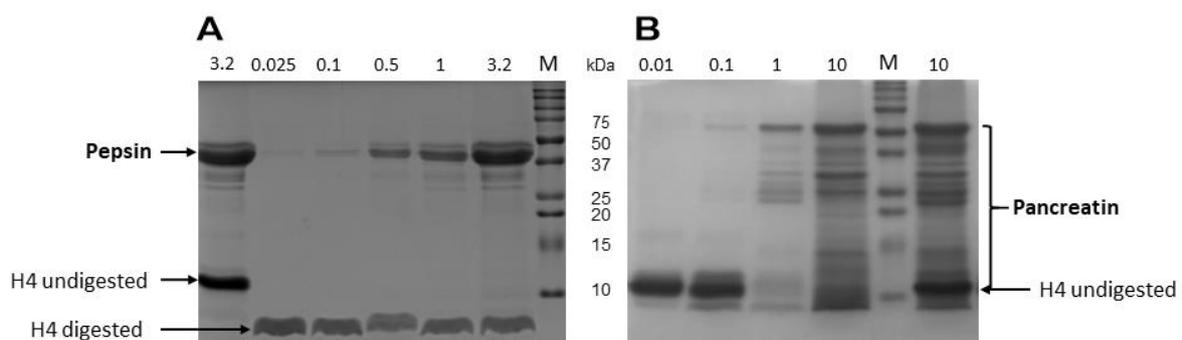
### **Gastric and intestinal digestions of H4**

Affitin H4 (0.5 mg/mL) was incubated at 37 °C for 30 min in simulated *in vitro* gastric (FaSSGF) and intestinal (FaSSIF) fluids containing the corresponding enzymes to evaluate its proteolytic degradation. Pepsin is the only proteolytic enzyme in the human stomach. Its concentration fluctuates between individuals and digestion states and ranges from 0.01 to 3.2 mg/mL (Jantratid et al. 2008; Maeng et al. 2019; Liu et al. 2015). Commercial Pancreatin mixture contains all the important enzymes (protease, amylase and lipase) found in intestinal lumen and it is frequently used in simulated intestinal media at concentrations ranging from 0.01 to 10 mg/mL (Jantratid et al. 2008; Maeng et al. 2019; Liu et al. 2015). The extents of H4 enzymatic digestions were estimated by SDS-PAGE under reducing conditions. The control samples without digestion were obtained by inactivating digestive enzymatic activity before

including Affitins, i.e. adding  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  for gastric digestions and heating the samples for 10 min at 100 °C for intestinal digestions.

Whatever protease concentration used, H4 was degraded into a single lower molecular weight band in the gastric medium (Fig. 1A). We further observed that the remaining fragment was stable and completely resistant to proteolysis by pepsin during the duration of digestion in the stomach and for more than 24 h. In contrast, H4 was fully digested and disappeared in the intestinal medium (Fig. 1B).

Given the total H4 degradation in simulated intestinal fluid, it was not possible to consider H4 engineering to improve its proteolytic degradation. On the other hand, the apparent stability of H4 in simulated gastric fluid encouraged us to investigate additional rational protein designs.



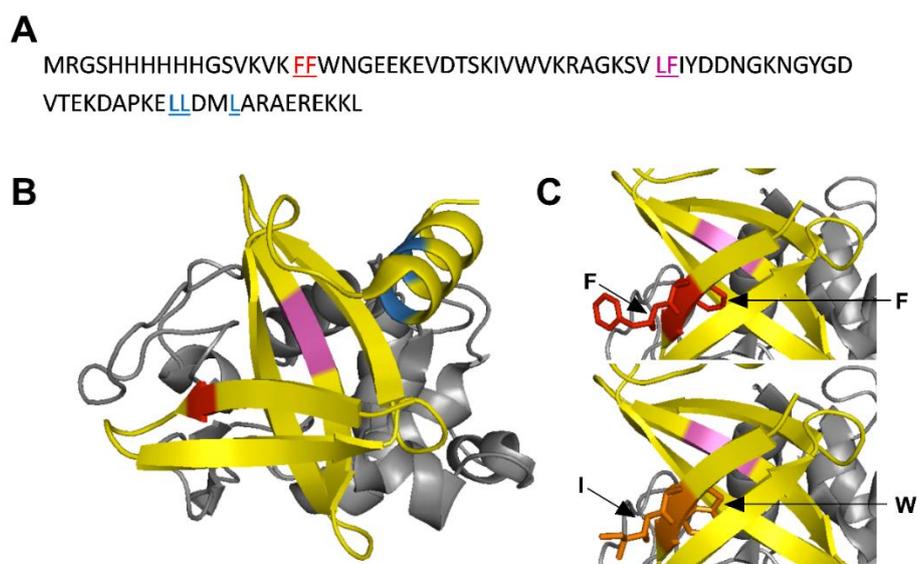
**Figure 49.** (Figure 1.) Proteolytic digestion of H4 by (A) Pepsin in FaSSGF or (B) pancreatin in FaSSIF.

Proteins (0.5 mg/mL, 5  $\mu\text{g}$ ) were separated by SDS-PAGE under reducing conditions and stained with Coomassie brilliant blue after they were incubated for 30 min (A) with different pepsin concentrations in FaSSGF medium (pH 1.6). Lane 1: Molecular mass markers (M); Lane 2: control without H4 digestion (5 mg/mL denatured pepsin); lane 3: 0.01 mg/mL pepsin; lane 4: 0.1 mg/mL; lane 5: 1 mg/mL; lane 6: 3.2 mg/mL or (B) with different pancreatin concentrations in FaSSIF medium (pH 6.5). Lane 1: 0.01 mg/mL pancreatin; lane 2: 0.1 mg/mL; lane 3: 1 mg/mL; lane 4: 10 mg/mL; Lane 5: Molecular mass markers (M); lane 6: control without H4 digestion (10 mg/mL denatured pancreatin). Full-length gels are shown in supplementary Fig. S1.

### Identification of the cleavage sites after pepsin digestion of H4

In order to identify the cleavage sites in H4 sequence, two complementary approaches were employed. *In silico* digestion was first performed using the ExPASyMass software

([https://web.expasy.org/peptide\\_mass/](https://web.expasy.org/peptide_mass/)) which theoretically predicted the residues cleaved after pepsin proteolysis at pH 1.3. Three cleavage sites were found as indicated in Fig. 2A and Fig. 2B. The first one occurred on the first  $\beta$  sheet between phenylalanine 6 (F6) and F7 residues (marked in red). The second one occurred between leucine 31 (L31) and F32 on the central  $\beta$  sheet known to be involved in the target interaction (marked in magenta). The last one was located in the C-terminal  $\alpha$  helix and implicated residues L54, L55 and L58 (marked in blue).

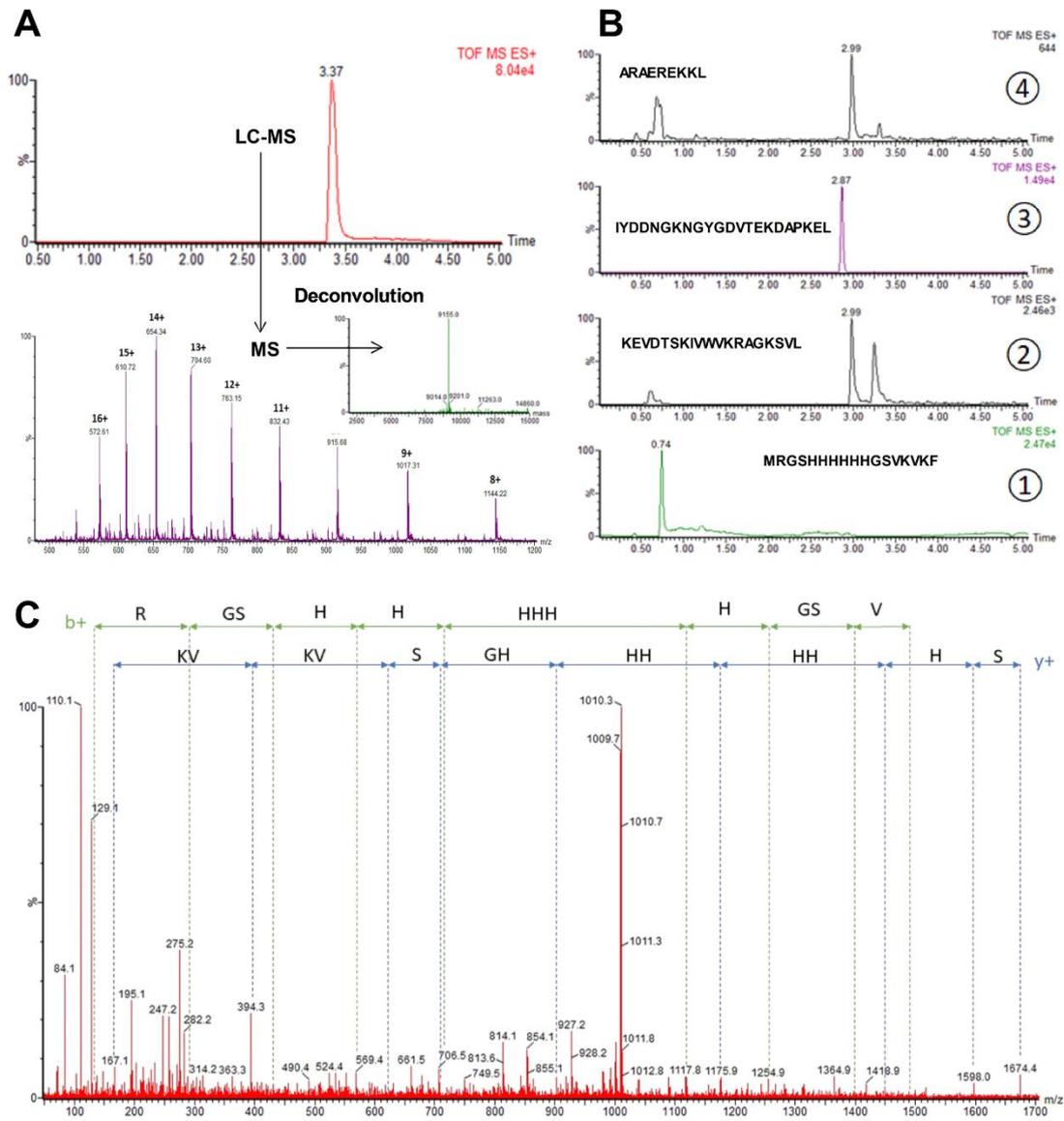


**Figure 50.** (Figure 2.) Location of amino acids involved in pepsin digestion of H4 at pH 1.3.

The positions of aromatic residues implicated in the pepsin digestion of H4 are shown in the 3-D structure of the central domain determined by X-ray crystallography (PDB: 4CJ2)(Correa et al. 2014b). A) Amino acid sequence of H4 with *in silico* predicted digestion sites underlined. B) The amino acids F6 and F7 (red) are on  $\beta$ -sheet. The amino acids L31 and F32 (magenta) are located on the binding interface with the lysozyme (black). The amino acids L54, L55 and L58 (blue) are on the C-terminal  $\alpha$ -helix. C) The amino acids F6 and F7 (red) in H4 were substituted by a Tryptophan (W) and an Isoleucine (I) respectively (yellow) in mutant M1. All of the structures were drawn using PyMOL software.

Mass spectrometry experiments were then performed to validate our *in silico* observations and to identify the digested fragments produced after H4 pepsin proteolysis. As shown in Fig. 3A, undigested H4 analysis showed only one chromatographic peak at 3.37 min. Mass spectrum deconvolution revealed the presence of a single molecule with a molecular weight of 9155 Da corresponding to H4 and indicating that pepsin activity was efficiently stopped. In contrast, digested H4 analysis indicated the existence of 4 major fragments with specific

retention time and confirming the presence of the three *in silico* predicted cleavage sites (Fig. 3B). Major precursor ions related to peptide fragments were then selected for MS/MS fragmentations (Fig. 3C) and fragmentation patterns obtained after MS/MS analyses clearly confirmed expected peptide sequences.



**Figure 51.** (Figure 3.) Mass spectrometry analysis of undigested and digested H4.

A) LC-MS chromatogram obtained for undigested H4 and underlying mass spectrum with deconvoluted mass spectra. B) Extracted ion chromatograms obtained after H4 pepsin proteolysis. C) MS/MS spectrum of the first peptide fragment of digested H4 (MRGSHHHHHGSKVKKF, MS/MS of the doubly charged precursor at  $m/z$  678.8).

### Protein engineering of H4 by site-directed mutagenesis

To improve proteolytic stability of Affitins, rational protein engineering by site-directed mutagenesis was implemented in this study. Different criteria were considered to choose the mutated amino acids. First, based on protein structure and function knowledges (Betts et Russell 2003), we selected residue substitutions known to conserve the wild-type properties for either conformation and activity. Second, we took into consideration the susceptibility of two specific residues to be cleaved by pepsin (Hamuro et al. 2008; Ahn et al. 2013). Three mutants M1, M2 and M3 (Table 1 and supplementary Table S1) were thus designed to investigate the impact of the mutated amino acids on the proteolytic degradation by pepsin. M1 corresponds to the double mutations of F6 to tryptophan (W6) and F7 to isoleucine (I7), M2 carries the double mutations of L31 to I31 and F32 to W32, and M3 possesses three mutations L54 to I54, L55 to valine (V55) and L58 to I58. Directed mutagenesis was performed by PCR with custom-synthesized primers (supplementary Table S2). The mutants were constructed from H4 plasmid (Pecorari et Alzari 2008). After cloning and transformation in bacteria, mutations were confirmed by DNA sequencing. Then, the proteins were overexpressed in *E. coli* host and purified by affinity chromatography (Ni-NTA) followed by size-exclusion chromatography. The Affitins were more than 95 % pure based on SDS-PAGE analysis (supplementary Fig. S2). Interestingly, compared with the wild-type counterpart (Table 1), the production yield of M1 was increased more than 4-fold from 10 mg to 44.5 mg *per* liter of culture while the production yields of M2 and M3 were slightly reduced or similar (respectively 5.5 and 8.3 mg).

**Tableau 8.** Table 1 – Characteristics of wild-type and mutated H4

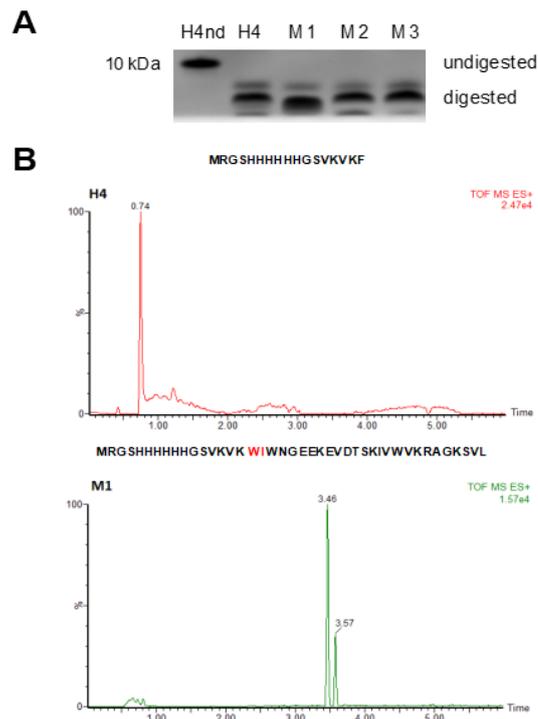
	Mutations	MM <sup>a</sup>	EC <sup>b</sup>	Yield <sup>c</sup>	K <sub>D</sub> <sup>d</sup> [Chi2 <sup>e</sup> ]
<b>H4</b>	/	9146.34	13980	10.0±0.1	6.37 [5.16]
<b>M1</b>	F6W-F7I	9151.36	19480	44.5±2.0	3.98 [2.57]
<b>M2</b>	L31I-F32W	9185.37	19480	5.5±0.2	440 [0.10]
<b>M3</b>	L54I-L55V-L58I	9132.31	13980	8.3±1.4	7.5 [2.51]

<sup>a</sup> Molecular mass (MM) in g.mol<sup>-1</sup>. <sup>b</sup> Molar extinction coefficient (EC) at 280 nm in M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>. <sup>c</sup> mg of Affitin purified from 1 L of growth medium. <sup>d</sup> Equilibrium dissociation constant in nM and <sup>e</sup> chi2 in RU measured by SPR measurements with concentrations of Affitin from 15.6 nM to 500 nM.

### Gastric digestion of H4 mutants

First, we verified whether the inserted mutations conferred resistance to gastric digestion on the mutants. Since only one of the three identified cleavage sites was modified in each mutant, we did not expect to totally protect the proteins from digestion. In order to better analyse the resulted fragments produced after pepsin incubation of Affitins, more resolving SDS-PAGE experiments were performed using tricine instead of glycine SDS-PAGE gels. The presence of both glycerol and urea also resulted in better separation of each fragment. The separation monitored by tricine SDS-PAGE gels of the fragments produced by pepsin digestion of H4 and the three mutants M1, M2 and M3 is showed in Fig. 4A. They all presented three bands. Even if the tricine SDS-PAGE analysis enable to differentiate the different fragments, it is still not sufficiently resolving to allow us to associate one band to each fragment. Due to low molecular weight, some fragments appeared near the dye front. Nevertheless, we could notice that the digestion pattern of M1 (lane 3) was different from that of H4 (lane 2) while those of M2 (lane 4) and M3 (lane 5) seemed similar. Noteworthy, the main band of M1 after digestion migrates faster while the resulting fragment after digestion is of a larger size. This result can be explained by the presence of urea which modify the migration of the fragments. Indeed, in absence of urea, the main band of M1 after digestion migrates less quickly through the gel than the one of H4, suggesting a larger fragment size as expected (supplementary Fig. S4).

Mass spectrometry experiments confirmed that the introduced mutations in M2 and M3 did not protect them against pepsin proteolysis. Interestingly, mass spectrometry spectra showed that changing the residues 6 and 7 from F-F to W-I in M1 conferred resistance to pepsin cleavage (Fig. 4B). When a manual research of peptide was made, the peptide MRGSHHHHHHGSVKVKW was not found, whereas the peptide MRGSHHHHHHGSVKVKWIWNGEEKEVDTSKIVWVKRAGKSVL appeared at 3.46 min (Fig. 4B). Of note, MRGSHHHHHHGSVKVKWIWNGEEKEVDTSKIVWVKRAGKSVL generated two chromatographic peaks (3.46 min and 3.57 min) with similar m/z which could stem from isomeric forms.



**Figure 52.** (Figure 4.) Analysis of the pepsin digest of (A) H4 and mutants by tricine SDS-PAGE and (B) H4 and M1 by mass spectrometry.

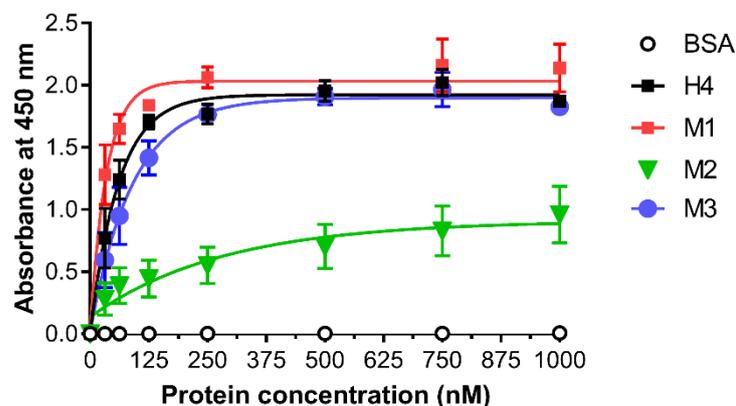
A) Tricine-SDS-PAGE analysis of wild-type and mutated H4 Affitins (0.5 mg/mL, 5 µg) incubated for 30 min in presence of pepsin (0.1 mg/mL). M: Molecular mass markers; Lane 1: H4 without digestion (nd); lane 2: H4; lane 3: M1; lane 4: M2; lane 5: M3. Full-length gel is shown in supplementary Fig. S3. B) Extracted ion chromatograms corresponding to the first peptide generated with pepsin for H4 and M1.

### Effect of mutations on protein binding

In order to assess whether the introduced mutations interfere with the Affitin binding property, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) experiments were carried out. We investigated the interaction of H4 and its mutants with its specific target lysozyme. Figure 5 revealed that M2 mutant exhibited strong decrease of lysozyme binding compared with H4 and M3. In contrast, the binding efficiency of M1 appeared to be increased.

As an alternative approach to evaluate the interaction of Affitins with lysozyme, Surface Plasmon Resonance (SPR) experiments were monitored at 25 °C. Lysozyme was immobilized on a CM5 chip by amine coupling (200 RU) and the association (2 min) and dissociation (7 min) of each Affitin were measured. As shown in Table 1 and compared with the equilibrium dissociation constant  $K_D$  of H4 (6.37 nM), M1 displayed the highest apparent affinity towards

lysozyme ( $K_D$  of 3.98 nM), in particular through a 2-fold increase of its apparent association rate constant. No tangible changes in kinetic values of M3 were observed compared with wild-type while M2 displayed a dramatic decreased apparent affinity ( $K_D$  of 440 nM).



**Figure 53.** (Figure 5.) Specific binding of H4 and mutants to lysozyme by ELISA.

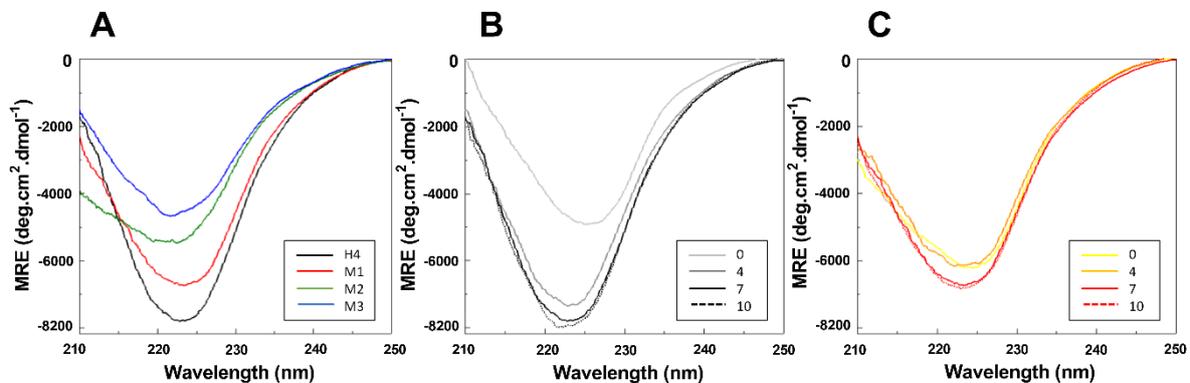
After lysozyme immobilisation on plates, increasing concentrations of Affitins from 31.25 nM to 1000 nM were incubated for 1 h at room temperature and their binding were detected with HRP-conjugated anti-RGS-6His antibody and absorbance at 450 nm. Commercial BSA were used as negative control. Results are presented as means and error bars represent standard deviations of absorbances achieved from at least three experiments.

### Effect of mutations on protein secondary structure and pH stability

To inspect whether the secondary structure of Affitins was changed by the mutations, far-UV CD spectra of the wild-type and mutated proteins were recorded from 210 to 250 nm at 20 °C in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7. As previously described (Pacheco et al. 2014; Béhar et al. 2013; Edmondson et Shriver 2001), H4 displayed a spectrum characteristic of  $\beta$ -stranded proteins with an  $\alpha$  helix contribution, with a negative band near 222 nm (Fig. 6A). The far-UV CD spectra of mutants showed that the mutations did not seem to disrupt secondary structure of the proteins (Fig. 6A). These results suggested that the overall structure of mutants has not been considerably changed by mutations. Nevertheless, whereas the mutants still adopted a well-defined fold, their resulted conformations appeared to be different from that of the wild-type H4.

pH stability was also assessed by incubating the proteins overnight in 20 mM sodium phosphate buffer at pH ranging from 0 to 10. CD spectra indicated that the secondary

structure of mutants (Fig. 6C and supplementary Fig. S5) remained widely stable as for H4 (Fig. 6B). It is noteworthy that M1 even seemed to display a higher stability at pH 0 (Fig. 6C) than H4 (Fig. 6B).



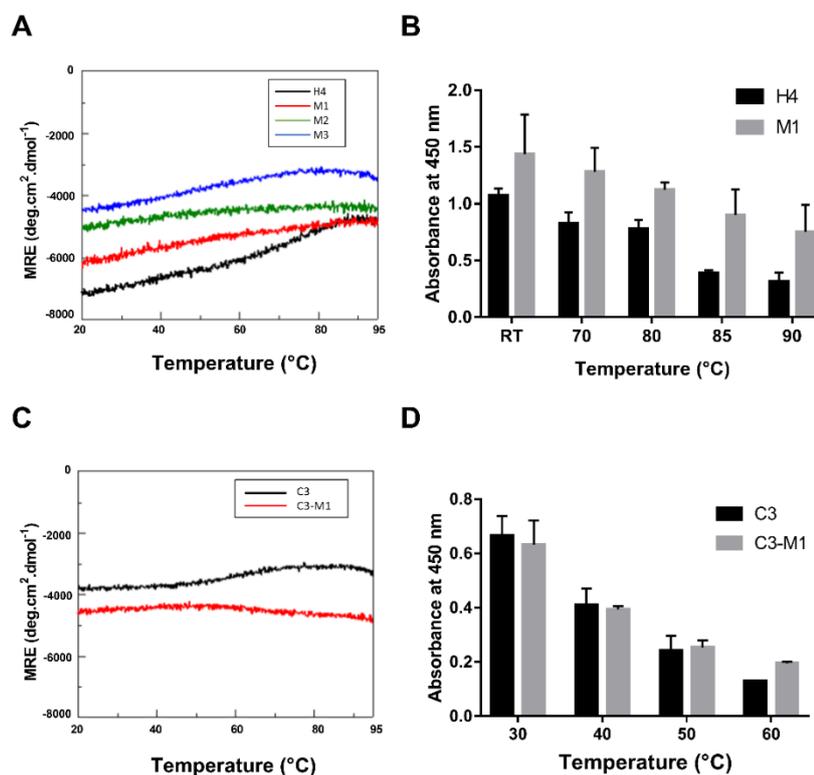
**Figure 54.** (Figure 6.) Secondary structure of H4 and mutants by circular dichroism.

Far-UV CD spectra of 0.25 mg/mL H4 (wild-type or mutants) were recorded at 20 °C in 20 mM sodium phosphate buffer at pH 7 (A) or at different pH ranging from 0 to 10 for H4 (B) and M1 (C).

### Effect of mutations on thermostability

Thermostability was evaluated by two methods. First, CD measurements at 222 nm in potassium phosphate buffer, pH 7.4 were recorded at temperatures ranging from 20 to 95 °C. Secondly, binding properties of Affitins were investigated by ELISA after they were pre-incubated for 1 h at temperatures ranging from room temperature to 90 °C prior to their incubation with lysozyme.

Results indicated that wild-type and mutants exhibited high thermostability with similar spectrum profiles (Fig. 7A). Interestingly, we noticed that, compared with H4 (in black, Fig. 7A), M1 (in red, Fig. 7A) appeared to display a slightly enhanced thermal resistance, as seen by its negligible change of ellipticity at 222 nm from 20 to 95 °C. This increased thermostability of M1 was confirmed by ELISA experiments (Fig. 7B). Increasing the pre-incubation temperature reduced protein binding for both H4 and M1, but the reduction was more pronounced for H4 and the absorbance of M1 was more than 2-fold higher than that of H4 after pre-incubation for 1 h at 90 °C (Fig. 7B).



**Figure 55.** (Figure 7.) Thermostability of wild-type and mutated Affitins.

CD measurements at 222 nm of 0.25 mg/mL wild-type and mutated H4 (A) or C3 (C) were recorded in 20 mM potassium phosphate buffer at pH 7.4 and at temperatures ranging from 20 to 95 °C. 125 nM H4 or M1 (B) or 500 nM C3 or C3-M1 (D) were pre-incubated in PBS-T for 1 h at different indicated temperatures before they were incubated for 1 h at room temperature with their specific target. Bindings were detected with anti-RGS-6His-HRP antibody conjugate and absorbance at 450 nm. Data points represent mean and error bars represent standard deviation of absorbances achieved from at least three experiments.

### Effect of mutations at residues 6 and 7 on Affitin properties

Taken together, our results emphasized that the double mutations introduced in M1 not only retain the remarkable known properties of Affitins (pH and thermal stabilities, strong binding, high production yield) but they also conferred notable improvements. To confirm these observations, we inserted the same mutations into the sequence of another Affitin. For ease to the following characterizations, we used the previously described Affitin C3 that targets human immunoglobulin G (hIgG) (Béhar et al. 2013). Table 2 confirmed that mutating the residues F6 to W6 and L7 to I7 in the sequence of C3 provides the same improvements than those we have observed with H4: an increase in production yield (3.1-fold) and an increase in

the apparent affinity, corresponding to a decrease in the equilibrium association constant  $K_D$  (6.4-fold). In addition, we also confirmed that C3-M1 retained its excellent stability properties under extreme conditions such as pH (supplementary Fig. S6) and thermal (Fig. 7C and Fig. 7D). As for H4 and compared with C3 (in black), we observed that C3-M1 (in red) retained high thermostability, as seen by its negligible change of ellipticity at 222 nm from 20 to 95 °C (Fig. 7C). Moreover, for each pre-incubation temperature used from 30 to 60 °C, the absorbance of C3-M1 was higher (at 60 °C) or similar (at 30, 40 and 50 °C) than that of C3 (Fig. 7D). Both C3 and C3-M1 lost their affinity at temperature above 70 °C.

**Tableau 9.** Table 2 – Characteristics of wild-type and mutated C3.

	<b>Mutations</b>	<b>MM<sup>a</sup></b>	<b>EC<sup>b</sup></b>	<b>Yield<sup>c</sup></b>	<b>K<sub>D</sub><sup>d</sup> [Chi2<sup>e</sup>]</b>
<b>C3</b>	/	9068.24	2980	6.5 ± 0.2	615 [0.84]
<b>C3-M1</b>	F6W-L7I	9107.28	8480	20.0 ± 0.3	96.7 [2.56]

<sup>a</sup> Molecular mass (MM) in g.mol<sup>-1</sup>. <sup>b</sup> Molar extinction coefficient (EC) at 280 nm in M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>. <sup>c</sup> mg of Affitin purified from 1 L of growth medium. <sup>d</sup> Equilibrium dissociation constant in nM and <sup>e</sup> chi2 in RU measured by SPR measurements with concentrations of Affitin from 31.2 nM to 1000 nM.

## Discussion

Clinical applications can require that proteins exhibit both high affinity and structural stability under harsh conditions. These qualities are even more important if an oral administration is considered. Indeed, the gastrointestinal transit is particularly challenging for therapeutic proteins because of the presence of proteases whose mission is precisely to degrade proteins to ensure proper digestion of food and provide essential nutrients to tissues and cells throughout the body.

The goal of this study was first to evaluate the bioavailability of Affitins, a new class of specific affinity binders (Škrlec, Štrukelj, et Berlec 2015; Gebauer et Skerra 2019) by investigating their stability in simulated gastric (FaSSGF) and intestinal (FaSSIF) fluids. For this purpose, FaSSGF and FaSSIF were prepared based on the updated composition proposed by Biorelevant.com. Due to a large variation of parameters described in literature (Jantratid et al. 2008; Maeng et

al. 2019; Liu et al. 2015), a wide range of protease concentrations were tested. As proof of concept, we used the Affitin H4 which targets hen egg white lysozyme (Pecorari et Alzari 2008; Correa et al. 2014). Although rapidly digested in intestinal medium, H4 appeared to be degraded in stable fragments in gastric medium. In the same simulated conditions, similar stable fragments were obtained with all the other Affitins we tested, while a total disappearance of proteins was observed with other biological binders we examined, such as an antibody and a nanobody (data not shown). These results further confirmed the particular high stability of Affitins under extreme conditions (e.g. pH 1.6 and presence of pepsin). In addition, in a context of increasing societal pressure for the rational use of animals for research, the development and use of alternative models is widely recommended. Our study highlighted that biorelevant *in vitro* simulated media and *in silico* modelling enable to investigate the gastrointestinal degradation of therapeutic proteins and to predict their oral behaviour, constituting a first step to understand their *in vivo* pharmacokinetics.

Digestion of Affitins thus generated small fragments that did no longer interact with their target, preventing the oral administration of Affitins during medical processes. Due to this proteolytic digestion, there is an interest in generating mutations that may lead to improved properties. We first needed to identify the cleavage sites generated by pepsin digestion. Mass spectrometry experiments combined with computer tools allowed us to detect three sites of cleavage at different locations in H4 sequence. Previous work already showed that mass spectrometry can provide in-depth analysis of peptides produced after digestion of proteins (hazelnut allergens) (Korte, Bräcker, et Brockmeyer 2017). Subsequently, our purpose was to introduce specific mutations in H4 to optimize the bioavailability of Affitins. Nevertheless, any sequence change could affect the interaction and structure integrity of the protein. It has already been shown that the mutations of F32 (corresponding to F31 in Sso7d) in tyrosine and alanine residues significantly reduced its stability (Catanzano et al. 1998). F32 is a member of the aromatic cluster in the protein core which is considered fundamental for the stability of the native conformation. Thus, slight conformational changes in this domain, and also at the two other cleavage positions, might adversely affect the protein affinity. It may therefore be important to keep amino acid conformations close together. Thereby, computer tools were used to design H4 mutants. We considered the preferential substitutions of amino acid in proteins that preserve structures and functions (Betts et Russell 2003) and the probabilities of

two residues to be cleaved by pepsin (which affects in particular L and F) (Hamuro et al. 2008; Ahn et al. 2013). The library of Sac7d variants generated to select Affitins is composed of conserved residues and fourteen random residues (Correa et al. 2014). It is noteworthy that only F7 and L31 are randomized residues, thus specifically selected in H4. The five others (F6 and F32, L54, L55 and L58) are conserved in all Affitins. Moreover, as indicated by Correa *et al.* (Correa et al. 2014), L31 and F32 did not appear to be directly involved in the interaction with lysozyme but they are part of the binding interface.

Based on these knowledges, precise mutations were chosen at the identified cleavage positions. The conserved F6 and F32 have been replaced by a tryptophan in order to maintain protein conformation. Being both aromatic and hydrophobic, F and W residues prefer to be buried in protein hydrophobic cores and may be involved in protein stabilities by stacking interactions with other aromatic side chains (Betts et Russell 2003). In addition, these mutations allowed the insertion of an aromatic amino acid known to confer interesting spectroscopic properties (Ghisaidoobe et Chung 2014). The other residues (F7 and L31, L54, L55 and L58) were substituted by an isoleucine or a valine generally poorly recognized by pepsin (Hamuro et al. 2008; Ahn et al. 2013). Site-directed mutagenesis of the selected residues at the cleavage pepsin sites were performed and the three resulting mutants of H4 (M1, M2 and M3) were successfully expressed using *E. coli* and purified to homogeneity.

Using our simulated gastric fluid FaSSGF containing pepsin, we investigated whether the introduced substitutions protect Affitins against proteolytic digestion. Mutations in M1 (F6W-F7I) did effectively provide a resistance to pepsin digestion. On the contrary, we found that the mutations introduced in M2 (L31I-F32W) and M3 (L54I-L55V-L58I) did not cause any resistance against pepsin digestion, although slower degradation has been observed for M2. Interestingly, as indicated by mass spectrometry analyses, cleavages in M2 and M3 were not directly at the sites previously identified in wild-type but they were very close to them at one or two residues in mutants. These results suggest that, if a region of a protein containing proteolytic cleavage sites is particularly exposed, then even the introduction of more stable residues can be insufficient to regain stability against the protease. These two sites for pepsin digestion in M2 and M3 could still be highly exposed after both mutations, allowing the enzyme to degrade them.

We further investigated the effect of the three mutations in the structure and function characteristics of H4. The mutations did not seem to disrupt the protein secondary structure. We observed that the mutants still adopted a well-defined fold, however their resulted conformations appeared to be different from that of the wild-type H4. The difference was slight for M1. Magnitude of spectra could be affected by several factors included protein concentration and protein purity. But we could not exclude a minor rearrangement of M1, in particular in the  $\beta$ -sheet containing the mutated F6 and F7. On the contrary, the spectra of M2 and M3 did change from that of H4. The mutants still adopted a well-defined fold, but a significant shift and decrease of ellipticity intensity were observed. This shift in addition to the intensity decrease could indicate a decrease of  $\alpha$ -helix content, especially for M3 as the mutations are located in the unique  $\alpha$ -helix of H4. These spectrum changes could also be explained by an increase in  $\beta$ -sheet conformation and/or by rearrangement of the  $\beta$ -sheet structure. Indeed, a huge morphological and spectral diversity of  $\beta$ -structures has been shown in the far-UV CD region as  $\beta$ -sheet twisting in a protein greatly contributes to its CD spectrum (Micsonai et al. 2015). As mutations in M1 and M2 are located in  $\beta$ -sheet parts of H4, they could induce a rearrangement in these structures, explaining the variation in their spectrum, but not necessarily implying a variation in the overall protein structure. In addition, we introduced in mutants M1 and M2 a Trp amino acid which is known to make significant and distinctive contributions even to far-UV CD spectrum. Even if the CD spectrum of M3 showed variations in the shape and magnitude compared with H4, the mutations of the three L54, L55 and L58 did not alter the affinity of the protein to its target. As we already mentioned, this result is not surprising as CD spectra of  $\beta$ -sheet rich proteins are strongly dependent on the  $\beta$ -sheet twist and can show important spectral diversity (Micsonai et al. 2015). Thus, variations in the CD spectrum would not systematically imply variations in protein overall structure and in protein activity, as seen for M3. We found that the substitutions in M2 strongly decreased the binding of the protein to its target. Visual inspection of the three-dimensional structure of H4-lysozyme complex showed that the residues at these positions are closed to the binding interface with its target but they should not directly interact (Correa et al. 2014). Even if we performed preferential substitution to conserve structure and function, a slight modification of amino acids (such as L to I and F to W) in this area of interaction seemed to impact binding affinity. M2 mutations did not drastically modify the pattern of the CD spectra, suggesting that

they did not destabilize the protein. In addition, the M2 spectrum showed similar shape and magnitude variations compared to the M3 spectrum while the affinity of M3 was not affected by the corresponding mutations. Thus, either the mutations in M2 rather induce minor changes in the protein conformation which interfere with its target binding or finally, the corresponding amino acids (L31 and/or F32) are actually involved in the target interaction. Whatever the reason, we cannot consider introducing these mutations into Affitins, since not only they do not provide proteolysis resistance (in M2 and M3) but they also lead to a decrease in protein affinity (in M2).

Interestingly, the substitutions performed in M1 enable to trigger valuable properties, accordingly giving rise to several improvements. First, the mutations provided resistance to pepsin digestion. Secondly, the association efficiency of M1 was 2-fold greater than that of the wild-type protein. Thirdly, the production yield of M1 increased more than 4-fold compared to H4. Finally, we showed that M1 retained the important stability of H4 under extreme pH and temperature conditions. We could even notice a slight improvement of these stabilities as, unlike H4, M1 possessed a more structured CD spectrum at pH 0, closer to the one at pH 7. Moreover, at all temperatures used for pre-incubation of Affitins before its incubation with lysozyme, the interaction intensities of M1 were higher than those of H4, indicating that the irreversible denaturation of M1 was less important. We used homology modelling employing the crystal structure of Affitin H4 with lysozyme (PDB ID: 4CJ2) (Correa et al. 2014) and PyMOL software to visualize the impact of the mutations (Fig. 2C). Replacing F6 and F7 (in red) by a W and a I (in yellow) respectively did not seem to induce major conformational changes. For instance, although the side-chain of F6 is oriented toward the interior of H4 structure, its mutation into a W seemed surprisingly well accommodated with minimal steric hindrance from neighbor residues (K13 and W8). Interestingly, this substitution could induce minor conformational changes that slightly stabilize the 3D structure. Furthermore, W6 could induce a displacement of W8 which is in close proximity of lysozyme in the complex, less than 3Å, thereby reinforcing the affinity of the protein for its target. This effect could therefore be similar to what has been observed in antibodies with the so-called "second-sphere residues" which have an influence on binding site while being outside (Arkin et Wells 1998). The hydrolysis inhibition induced by mutations in M1 would probably be mainly due to the replacement of amino acids preferentially cleaved by pepsin (like F6 and F7)

by amino acids poorly recognized by the enzyme (Hamuro et al. 2008; Ahn et al. 2013). But we cannot exclude that the minor conformational changes, as discussed above by increasing stability, also protect the protein from pepsin cleavage at this position.

In order to validate that the remarkable effects of the residue substitutions in M1 can be transposed to another Affitin, we inserted the same mutations in the previously described Affitin C3 (Béhar et al. 2013) which targets antibodies. As such, F6 and L7 of Affitin C3 were replaced by W and I corresponding to the M1 double mutations. In addition to a noticeable production yield increase, we found that C3-M1 possesses a strong increase in its apparent affinity. CD experiments showed that C3-M1 displays a different spectrum profile than C3 while maintaining its target affinity and high stabilities towards pH and temperature variations. A proteolysis resistance was observed for C3-M1 between the residues 6 and 7. Nevertheless, the fourteen random residues composing the different Affitins lead to the presence of a L at position 8 in C3 sequence which was cleaved by pepsin.

Previous work has already shown that the randomization of about 20 % of the Sac7d-derived sequence does not alter the overall fold of the protein and that several tolerated mutations could be considered (Béhar et al. 2013). Our results showed that all mutant proteins are hyperthermostable in phosphate buffer and are highly resistant from low to high pH, in good agreement with Sul7d protein family (Kalichuk et al. 2016; Béhar et al. 2013; 2014). Altogether, our finding highlighted that the substitutions of F6 and residue 7 in Affitins by respectively W and I produced a mutant M1 that acquired outstanding properties. As these residues are not in the central surface of interaction with the target, we can consider systematically inserting them in the libraries, issued from Sul7d proteins, thereby programming these improvements in all selected Affitins. Moreover, to date, no W is present in the sequence, thus the insertion of a W residue would have additional advantages such as higher absorbance at 280 nm and exploitable fluorescence properties (Ghisaidoobe et Chung 2014). Rational protein engineering has already contributed to generate mutations with enhanced properties (Kintzing, Filsinger Interrante, et Cochran 2016; C. Niu et al. 2017; Chen et al. 2018; Tu et al. 2019). Frequently, this genetic approach can also simultaneously elucidate the structure-function relationship of a protein (Camilloni et al. 2016; Ashraf et al. 2019; Han et al. 2018). The effects of mutations on protein characteristics can lead to a better understanding of how protein residues and/or domains play an important role in modulating

structural and activity properties, thus providing a better guidance for future design proposals. Niu *et al.* found that substitutions of three residues (L99, L162 and E230) improved the pepsin resistance and that in addition, some of them increased their catalytic efficiency 1.3-2.4-fold and improved their stability at 60°C and pH 1-2 (C. Niu *et al.* 2017). Camilloni *et al.* showed that aggregation propensity of a protein can be modulated by mutating specific residues that change the average protection of its aggregation-prone surface residues without affecting its structure and stability (Camilloni *et al.* 2016). Ashraf *et al.* (Ashraf *et al.* 2019) and Han *et al.* (Chen *et al.* 2018; Han *et al.* 2018) demonstrated that modifications of non-catalytic residues can promote favourable catalytic behaviour and that substitutions of these residues could provide prospective candidates for industry applications.

## Conclusion

The oral delivery of therapeutic protein drugs is highly challenging as the digestive tract does not differentiate between therapeutic and non-therapeutic proteins. Since only proteins persisting the gastrointestinal transit in intact conformation can be considered for the oral route, simulated digestion assays are frequently employed as tools to discriminate between drugs. In particular, biorelevant media have fast emerged as a reliable tool to support drug discovery and development process and to minimize the need of animal and human experiments (Kaur, Narang, et Bansal 2018; Otsuka, Shono, et Dressman 2013; Jantratid *et al.* 2008; Korte, Bräcker, et Brockmeyer 2017). These *in vitro* models aim to mimic physiological conditions and have the advantages of being more rapid, less expensive, and without ethical restrictions. Our study emphasized that these models could actually predict the digestion profiles of a therapeutic protein.

Even if it can be difficult to anticipate all possible effects of rational design on protein properties, we successfully identified beneficial mutations for proteolytic resistance that also lead to additional improved properties, such as affinity, stability and production level. These improvements are particularly sought in the development of targeting agents for diagnosis and therapy like Affitins.

## Materials and Methods

### Materials

Unless otherwise specified, chemicals were purchased from Sigma-Aldrich and enzymes and buffers for molecular biology were purchased from Thermo Fisher Scientific. Oligonucleotides were purchased from Eurofins.

### Protein mutagenesis

Reactions were carried out using Phusion site directed mutagenesis protocol as described by manufacturer (Thermo Scientific), in a final reaction volume of 50  $\mu$ L with 10 ng of plasmid DNA derived from pQE30 (Qiagen) and encoding Affitins (pFP1001-H4 (Correa et al. 2014) or pFP1001-C3(Béhar et al. 2013)). Final reaction mixtures consisted of 1x concentrated Phusion HF buffer, 0.2 mM dNTP-Mix, 4 % DMSO, 0.25  $\mu$ M forward primer and reverse primer (stock solutions dissolved in ddH<sub>2</sub>O) and 1 unit of Phusion Hot Start II DNA polymerase. The primers used are described in Table S1. PCR reactions were realized under the following conditions: a) initial denaturation: 98 °C (30 sec); b) cycling (25 passes in total): 98 °C (30 sec), 60 °C (50 sec) and 72 °C (150 sec) c) final elongation: 72 °C (10 min). Following PCR, samples were analysed by agarose gel electrophoresis (100 V; 1 h) (1 % (w/v) agarose in TAE buffer, using a 1 kb DNA ladder as standard for size determination. After confirmation of correct band sizes, PCR products were digested 1 h at 37 °C by 1  $\mu$ L DpnI (100 U/ $\mu$ L). Then PCR product was transformed into *E. coli* DH5 $\alpha$ Laclq strain (Invitrogen) and some colonies were amplified using a Wizard Plus SV MiniPrep DNA purification system Kit (Promega). Concentrations of purified PCR products were determined by absorbance measurements at 260 nm using a NanoDrop spectrophotometer. DNA samples were sent for sequencing (Eurofins) in order to verify amino acid sequences.

### Protein production and purification

Protein preparations were performed similarly for mutated and original wild-type proteins as described previously (Mouratou et al. 2007) with modifications. Competent *E. coli* DH5 $\alpha$ Laclq were transformed by heat shock at 42 °C with the plasmid coding for the protein and grown in overnight stirring preculture (50 mL in 2YT medium containing 100  $\mu$ g/mL ampicillin, 25

µg/mL kanamycin and 1 % glucose at 37 °C). 20 mL of preculture were then inoculated in 1 L of 2YT medium (with 100 µg/mL ampicillin, 25 µg/mL kanamycin, 0.1 % glucose). Expression was induced when the absorbance (OD<sub>600</sub>) reached 0.8- 1.0 by 0.5 mM IPTG, and cultures were shaken at 30 °C during 3 h. Cultures were harvested by centrifugation and the bacterial pellets were resuspended in lysis buffer (Tris-HCl 20 mM pH 7.4, 500 mM NaCl, 25 mM imidazole) and disrupted by several gentle sonications. Cell debris were pelleted by centrifugation and supernatants, containing the protein of interest, were incubated with 1.5 mL of nickel affinity resin (Ni-NTA, GE Healthcare) at room temperature for 1 h. Proteins containing six N-terminal histidine residues were purified on a 5 mL HiTrap column. Elutions were performed with 5 mL of PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) with 250 mM Imidazole. Proteins were further purified by size-exclusion chromatography on a Superdex 75 column (GE Healthcare) equilibrated with PBS. Fractions were pooled and concentrations were determined using a NanoDrop spectrophotometer. Proteins were used for biochemical characterization.

#### **Simulated gastric fluid digestion assay**

Gastric digestion media corresponding to the fasted-state were prepared according to the instructions provided by Biorelevant.com Ltd and consists of a solution made by dissolving 0.06 mg/mL of FaSSIF, FeSSIF & FaSSGF powder, purchased from Biorelevant.com, in 34.2 mM NaCl at a pH of 1.6 adjusted with HCl. Then pepsin is added extemporaneously (from 0.01 to 3.2 mg/mL). Affitins were added at a final concentration of 0.5 mg/mL and were then incubated for 30 minutes at 37 °C with stirring. Reactions were quenched with 200 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Samples were stored at -20 °C until use.

#### **Simulated intestinal fluid digestion assay**

Intestinal digestion media corresponding to the fasted-state were prepared according to the instructions provided by Biorelevant.com Ltd and consists of a solution made by dissolving 2.24 mg/mL of FaSSIF, FeSSIF & FaSSGF powder in a buffer containing NaOH 10 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 28.66 mM and NaCl 105.88 mM at pH 6.5. Then pancreatin is added extemporaneously (from 0.01 to 10 mg/mL). Affitins were added at a final concentration of 0.5 mg/ml and were then incubated for 30 min at 37 °C with stirring. Reactions were quenched by heating at 100 °C for 10 min. Samples were stored at -20 °C until use.

### **Mass spectrometry analysis**

Affitins were prepared at a concentration of 0.5 mg/mL with or without pepsin digestion. An SDS-PAGE electrophoresis gel with 15 % acrylamide was made to ensure that proteins have been well digested with pepsin. 100 µL of sample are put in restrictors themselves placed in LC vials (Macherey Nagels). LC-MS/MS analyses were performed as described previously with minor modifications (Charpentier et al. 2016), on a Synapt™ G2 HRMS Q-TOF mass spectrometer equipped with an electrospray ionization (ESI) interface operating in the positive mode and an Acquity H-Class® UPLC™ device (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Peptides were separated on a BEH C<sub>18</sub> column (2.1 × 100 mm; 1.7 µm; Waters Corporation) with a linear gradient of mobile phase B (100 % acetonitrile) in mobile phase A (5 % acetonitrile), each containing 0.1 % formic acid, and at a flow rate of 400 µL/min. Mobile phase B was kept constant at 1 % for 1 min, then linearly increased from 1 % to 99 % for 10 min, kept constant at 99 % for 1 min, returned to the initial condition over 1 min, and kept constant for 2 min before the next injection. The column temperature was maintained at 60 °C throughout the run. Peptides were then detected by the mass spectrometer with the ESI interface operating in the positive ion mode (capillary voltage, 3 kV; desolvation gas (N<sub>2</sub>) flow and temperature, 900 L/h and 400 °C; source temperature, 150 °C). Data were acquired at the rate of 4 spectra/sec and the acquisition window was set from m/z 50 to 4000. For MS/MS experiments, major precursor ions were selected according to their specific m/z and then fragmented with a collision energy set at 30 V. The multiple charge state distributions of intact proteins were deconvoluted by the use of MaxEnt1 software (Waters Corporation) and generated MS/MS spectra were manually analysed to find the sequence coverage of each protein.

### **Polyacrylamide gel electrophoresis**

The impact of pepsin digestion was studied by Sodium Dodecyl Sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) either by 15 % acrylamide gels in Tris/glycine/SDS running buffer (glycine-SDS-PAGE) or by 10 % acrylamide gels in Tris/tricine/SDS running buffer (tricine-SDS-PAGE). Samples (10 µL, 5 µg protein) were mixed with 4X loading buffer with β-mercaptoethanol and heated for 10 min at 100 °C. Gels were run in a Mini-PROTEAN Tetra cell system (Bio-Rad) for 1 h at 150 V (glycine-SDS-PAGE) or for 1h30 at 120 V (tricine-SDS-PAGE).

All Gels were stained overnight using PageBlue Protein Staining Solution (Thermo Fisher Scientific) and destained with different water baths. Image analyses of gels were performed using ImageLab software. Band sizes were determined by Precision Plus Protein all blue markers from Bio-Rad.

### **Target affinity and thermostability by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

In order to evaluate the binding specificity of mutated Affitins against its targets and their thermostability, ELISA experiments were carried out as described previously (Pacheco et al. 2014) with modifications. A Maxisorp plate (Nunc) was coated 1 h with 100  $\mu$ L of chicken lysozyme (Sigma) or hIgG (Tegeline, kindly provided by Bernard Vanhove, Nantes university) at 1 mg/mL and washed three times with PBS pH 7.4 before an overnight saturation with BSA 0.5 %. For binding specificity evaluation, 100  $\mu$ L of Affitins with concentrations ranging from 3.9 nM to 1  $\mu$ M in PBS pH 7.4 containing 0.1 % Tween20 (PBS-T) were added to the corresponding well and incubated for 1 h at room temperature. For thermostability evaluation, Affitins (125 nM) were first incubated in PBS-T for 1 h at different temperatures (from room temperature to 90 °C) and immediately cooled down on ice, then 100  $\mu$ L were added to the corresponding well and incubated for 1 h at room temperature. In both experiments, Affitins were tested for non-specific binding against BSA without target. After washing with PBS-T, the plates were incubated for 1 h at room temperature with 100  $\mu$ L anti-RGS-6His antibody (Qiagen, dilution 1:5000), conjugated with horseradish peroxidase (HRP). After washing with PBS-T, bound proteins were detected using 100  $\mu$ L of *ortho*-phenylenediamine (OPD) solution (1 mg/mL OPD, 0.05 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100 mM sodium citrate pH 5.0) as substrate. The absorbance at 450 nm was recorded with a plate reader (Tecan infinite M200 Pro).

### **Target affinity by Surface Plasmon Resonance (SPR)**

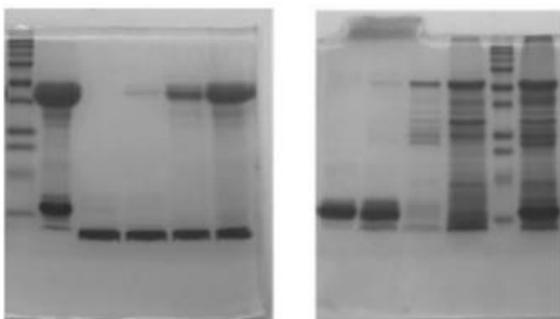
Association and dissociation of wild-type and mutated Affitins on their target were conducted at 25 °C by SPR experiments using a BIAcore T200 instrument. Targets (lysozyme or hIgG) were immobilized on a CM5 chip by amine coupling on two independent channels. Briefly, an NHS / EDC mix was injected onto a CM5 chip to generate reactive ester groups. Targets were diluted to 20  $\mu$ g/mL in sodium acetate buffer pH 5.5 or sodium acetate buffer pH 4.5 respectively and injected onto the activated chip on channels 2 and 4. Lysozyme and hIgG

were immobilized at 200 RU and 1200 RU respectively. The residual ester groups were inactivated by injection of a 1 M ethanolamine solution pH 8.5 for 10 min. The running buffer was HBSEP pH 7.4 (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA and 0.05 % P20). Affitins (H4, M1, M2 and M3) were injected in dose response on lysozyme at the following concentrations: 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 nM. Associations were measured for 2 min and dissociations for 7 min. The flow rate was set at 30  $\mu$ L/min and the regenerations were carried out by injection for 30 sec of a 10 mM NaOH solution. Affitins C3 and C3-M1 were injected in dose response on hIgG at the following concentrations: 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2 nM. Associations were measured for 2 min and dissociations for 5 min. The flow rate was set at 30  $\mu$ L/min and the regeneration carried out by the injection for 30 sec of a solution of 1 M ethanolamine pH 8.5. The resulting data were evaluated with BIAevaluation 3.1 and the kinetic parameters  $k_{on}$ ,  $k_{off}$ , and  $KD$  were calculated.

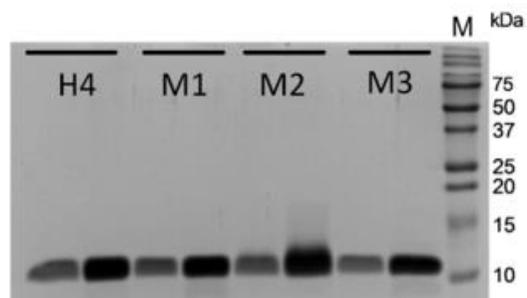
### **Structural analysis by Circular Dichroism (CD)**

Far-UV CD spectroscopy was used to determine the secondary structures of WT and mutated Affitins and to evaluate their stability at different pH and temperatures. Measurements were carried out in a Jasco J-810 instrument (Jasco, Lisses, France), using a quartz cell with a path length of 0.2 cm (Hellma, Paris, France). For pH stability, 0.25 mg/mL Affitins were incubated overnight at room temperature in 20 mM sodium phosphate buffer at pH ranging from 4 to 10 or in HCl 1N for pH 0. CD spectra were performed at 20 °C. For data processing, three consecutive scans were collected for each measurement from 210 to 250 nm and average spectra were smoothed and stored. Data were collected as ellipticity in units of millidegrees (mdeg) versus wavelength (nm). Thermal unfolding was monitored at 222 nm in potassium phosphate buffer, pH 7.4 in a temperature measurement mode starting from 20 to 95 °C with a scanning rate of 1 °C/min. Data were collected as ellipticity in units of millidegrees (mdeg) versus temperature (°C).

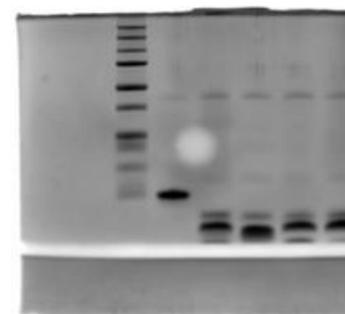
## Supplémentary information



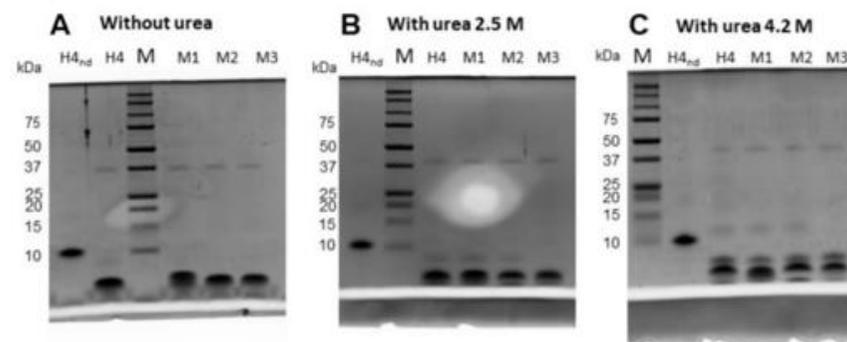
**Supplementary Figure S1.** Full-length gel images shown in Fig. 1. Full-length gel images of SDS-PAGE performed under reducing conditions and stained with Coomassie brilliant blue.



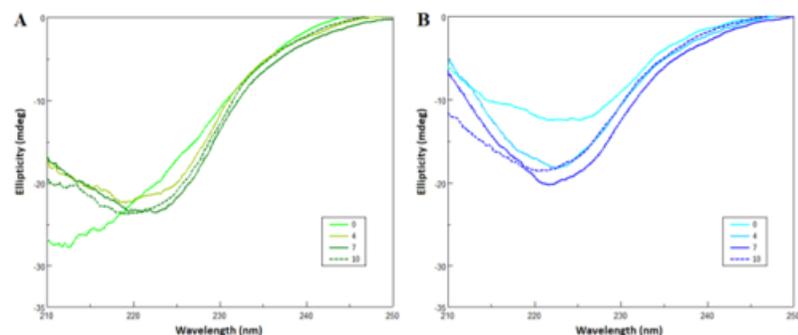
**Supplementary Figure S2.** Purities of wild-type and mutated H4 by SDS-PAGE. Purified proteins (1 and 3 µg) were separated by SDS-PAGE (15 % acrylamide gel) under reducing conditions and stained with Coomassie brilliant blue. M: Molecular mass markers.



**Supplementary Figure S3.** Full-length gel image shown in Fig. 4A. Full-length gel image of SDS-PAGE performed under reducing conditions and stained with Coomassie brilliant blue.

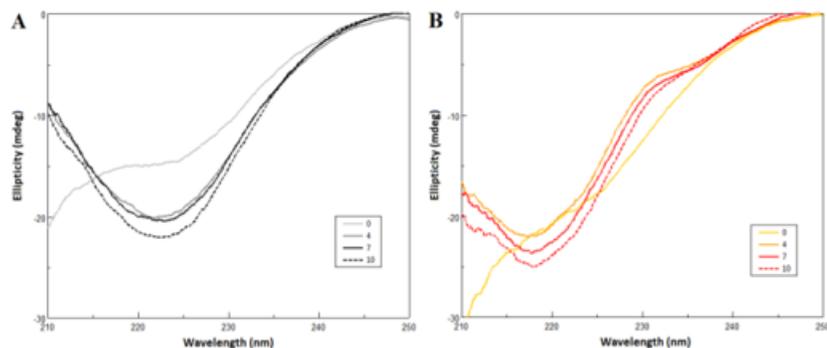


**Supplementary Figure S4.** Full-length gel images of Tricine SDS-PAGE in absence (A) or in presence of 2.5 M urea (B) or 4.2 M urea (C) under reducing conditions and stained with Coomassie brilliant blue.



Supplementary Figure S5. Secondary structure of M2 and M3 mutants by circular dichroism.

Far-UV CD spectra of 0.25 mg/mL of M2 (A) and M3 (B) were recorded at 20 °C in 20 mM sodium phosphate buffer at different pH ranging from 0 to 10.



Supplementary Figure S6. Secondary structure of wild-type and mutated C3 by circular dichroism.

Far-UV CD spectra of 0.25 mg/mL of C3 (A) and C3-M1 (B) were recorded at 20 °C in 20 mM sodium phosphate buffer at different pH ranging from 0 to 10.

Supplementary Table S1 – Amino acid sequences of Affitins with wild-type or mutated residues in bold.

Affitins	Amino acid sequences
H4	MRGSHHHHHHGSVKVKKFFWNGEKEVDTSKIVVVKRAGKSVLFIYDDNGKNGYGDVTEKDAPK ELLDMLARAEREKKNL
M1	MRGSHHHHHHGSVKVKK <b>WI</b> WNGEKEVDTSKIVVVKRAGKSVLFIYDDNGKNGYGDVTEKDAPK ELLDMLARAEREKKNL
M2	MRGSHHHHHHGSVKVKKFFWNGEKEVDTSKIVVVKRAGKSV <b>WI</b> YDDNGKNGYGDVTEKDAPK ELLDMLARAEREKKNL
M3	MRGSHHHHHHGSVKVKKFFWNGEKEVDTSKIVVVKRAGKSVLFIYDDNGKNGYGDVTEKDAPK EIVDMIARAEREKKNL
C3	MRGSHHHHHHGSVKVKK <b>FL</b> LNGEKEVDTSKIRDVCRQGKNVKFLYNDNGKYGAGNVDEKDAPK ELLDMLARAEREKKNL
C3-M1	MRGSHHHHHHGSVKVKK <b>WI</b> LNGEKEVDTSKIRDVCRQGKNVKFLYNDNGKYGAGNVDEKDAPK ELLDMLARAEREKKNL

Supplementary Table S2 – Primer sequences used for site-directed mutagenesis of H4.

Mutants	Mutations		nucleotide sequence (5'-3')
M1	F6W-F7I	F	CGGATCCGTC AAGGTGAAAT <b>GG</b> ATCTGGAACGGCGAAGAAA AAGAAGTGG
		R	CCACTTCTTTTCTTCGCCGTTCCAGATCCATTTACCTTGACG GATCCG
M2	L31I-F32W	F	GCGTGCGGGCAAAGTGT <b>ATCTGG</b> ATCTACGACGACAACG GC
		R	GCCGTTGTCGTCGTAGATCCAGATCACACTTTTGCCCGCACGC
M3	L54I-L55V-L58I	F	CCGAGAAAGATGCCCGAAAG <b>ATTG</b> TAGATATGATTGCG CGTGCGGAACGCG
		R	CGCGTCCGCACGCGCAATCATATCTACAATCTCTTTGCGGGC ATCTTCTCGG

The bold nucleotides correspond to the substituted bases

## References

- Ahn, Joomi, Min-Jie Cao, Ying Qing Yu, et John R. Engen. 2013. « Accessing the Reproducibility and Specificity of Pepsin and Other Aspartic Proteases ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1834 (6): 1222-29. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.10.003>.
- Angelis, Isabella De, et Laura Turco. 2011. « Caco-2 Cells as a Model for Intestinal Absorption ». *Current Protocols in Toxicology Chapter 20* (février): Unit20.6. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx2006s47>.
- Arkin, M. R., et J. A. Wells. 1998. « Probing the Importance of Second Sphere Residues in an Esterolytic Antibody by Phage Display ». *Journal of Molecular Biology* 284 (4): 1083-94. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2234>.
- Ashraf, Naeem Mahmood, Akshaya Krishnagopal, Aadil Hussain, David Kastner, Ahmed Mahmoud Mohammed Sayed, Yu-Keung Mok, Kunchithapadam Swaminathan, et Nadia Zeeshan. 2019. « Engineering of Serine Protease for Improved Thermostability and Catalytic Activity Using Rational Design ». *International Journal of Biological Macromolecules* 126 (avril): 229-37. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.218>.
- Béhar, Ghislaine, Marco Bellinzoni, Mike Maillason, Lauranne Paillard-Laurance, Pedro M. Alzari, Xuemei He, Barbara Mouratou, et Frédéric Pecorari. 2013. « Tolerance of the Archaeal Sac7d Scaffold Protein to Alternative Library Designs: Characterization of Anti-Immunoglobulin G Affitins ». *Protein Engineering, Design & Selection: PEDS* 26 (4): 267-75. <https://doi.org/10.1093/protein/gzs106>.
- Béhar, Ghislaine, Sabino Pacheco, Mike Maillason, Barbara Mouratou, et Frédéric Pecorari. 2014. « Switching an Anti-IgG Binding Site between Archaeal Extremophilic Proteins Results in Affitins with Enhanced PH Stability ». *Journal of Biotechnology* 192 Pt A (décembre): 123-29. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.10.006>.
- Béhar, Ghislaine, Axelle Renodon-Cornière, Stanimir Kambarev, Petar Vukojcic, Nathalie Caroff, Stéphane Corvec, Barbara Mouratou, et Frédéric Pecorari. 2019. « Whole-Bacterium Ribosome Display Selection for Isolation of Highly Specific Anti-Staphylococcus Aureus Affitins for Detection- and Capture-Based Biomedical Applications ». *Biotechnology and Bioengineering* 116 (8): 1844-55. <https://doi.org/10.1002/bit.26989>.
- Béhar, Ghislaine, Axelle Renodon-Cornière, Barbara Mouratou, et Frédéric Pecorari. 2016. « Affitins as Robust Tailored Reagents for Affinity Chromatography Purification of Antibodies and Non-Immunoglobulin Proteins ». *Journal of Chromatography. A* 1441 (avril): 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.02.068>.
- Betts, Matthew J., et Robert B. Russell. 2003. « Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions ». In *Bioinformatics for Geneticists*, 289-316. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0470867302.ch14>.
- Camilloni, Carlo, Benedetta Maria Sala, Pietro Sormanni, Riccardo Porcari, Alessandra Corazza, Matteo De Rosa, Stefano Zanini, et al. 2016. « Rational Design of Mutations That Change the Aggregation Rate of a Protein While Maintaining Its Native Structure and Stability ». *Scientific Reports* 6: 25559. <https://doi.org/10.1038/srep25559>.

- Catanzano, F., G. Graziano, P. Fusi, P. Tortora, et G. Barone. 1998. « Differential Scanning Calorimetry Study of the Thermodynamic Stability of Some Mutants of Sso7d from *Sulfolobus Solfataricus* ». *Biochemistry* 37 (29): 10493-98. <https://doi.org/10.1021/bi972994k>.
- Charpentier, Maud, Mikael Croyal, Delphine Carbonnelle, Agnès Fortun, Laetitia Florenceau, Catherine Rabu, Michel Krempf, Nathalie Labarrière, et François Lang. 2016. « IRES-Dependent Translation of the Long Non Coding RNA Meloe in Melanoma Cells Produces the Most Immunogenic MELOE Antigens ». *Oncotarget* 7 (37): 59704-13. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10923>.
- Chen, Xiutao, Weiguang Li, Peng Ji, Yang Zhao, Chengyao Hua, et Chao Han. 2018. « Engineering the Conserved and Noncatalytic Residues of a Thermostable  $\beta$ -1,4-Endoglucanase to Improve Specific Activity and Thermostability ». *Scientific Reports* 8 (1): 2954. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21246-8>.
- Cinier, Mathieu, Marc Petit, Monique N. Williams, Roxane M. Fabre, Frédéric Pecorari, Daniel R. Talham, Bruno Bujoli, et Charles Tellier. 2009. « Bisphosphonate Adaptors for Specific Protein Binding on Zirconium Phosphonate-Based Microarrays ». *Bioconjugate Chemistry* 20 (12): 2270-77. <https://doi.org/10.1021/bc9002597>.
- Correa, Agustín, Sabino Pacheco, Ariel E. Mechaly, Gonzalo Obal, Ghislaine Béhar, Barbara Mouratou, Pablo Opezzo, Pedro M. Alzari, et Frédéric Pecorari. 2014. « Potent and Specific Inhibition of Glycosidases by Small Artificial Binding Proteins (Affitins) ». *PloS One* 9 (5): e97438. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097438>.
- Daeihamed, Marjan, Simin Dadashzadeh, Azadeh Haeri, et Masoud Faghieh Akhlaghi. 2017. « Potential of Liposomes for Enhancement of Oral Drug Absorption ». *Current Drug Delivery* 14 (2): 289-303. <https://doi.org/10.2174/1567201813666160115125756>.
- De Mey, Marjan, Gaspard J. Lequeux, Jo Maertens, Cassandra I. De Muynck, Wim K. Soetaert, et Erick J. Vandamme. 2008. « Comparison of Protein Quantification and Extraction Methods Suitable for E. Coli Cultures ». *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization* 36 (3): 198-202. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2007.10.001>.
- Edelmann, Martin R., et Simon Hauri. 2021. « Functional in Vitro Assessment of Modified Antibodies: Impact of Label on Protein Properties ». *PLOS ONE* 16 (9): e0257342. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257342>.
- Edmondson, S. P., et J. W. Shriver. 2001. « DNA Binding Proteins Sac7d and Sso7d from *Sulfolobus* ». *Methods in Enzymology* 334: 129-45. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(01\)34463-4](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(01)34463-4).
- Fani, M., H. R. Maecke, et S. M. Okarvi. 2012. « Radiolabeled Peptides: Valuable Tools for the Detection and Treatment of Cancer ». *Theranostics* 2 (5): 481-501. <https://doi.org/10.7150/thno.4024>.
- Fernandes, Cláudia S. M., Raquel Dos Santos, Stella Ottengy, Aline Canani Viciński, Ghislaine Béhar, Barbara Mouratou, Frédéric Pecorari, et A. Cecília A. Roque. 2016. « Affitins for Protein Purification by Affinity Magnetic Fishing ». *Journal of Chromatography. A* 1457 (juillet): 50-58. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.06.020>.

Fruton, Joseph S. 2002. « A History of Pepsin and Related Enzymes ». *The Quarterly Review of Biology* 77 (2): 127-47. <https://doi.org/10.1086/340729>.

Gebauer, Michaela, et Arne Skerra. 2019. « Engineering of Binding Functions into Proteins ». *Current Opinion in Biotechnology* 60 (juin): 230-41. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.05.007>.

Ghisaidoobe, Amar B. T., et Sang J. Chung. 2014. « Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques ». *International Journal of Molecular Sciences* 15 (12): 22518-38. <https://doi.org/10.3390/ijms151222518>.

Goux, Marine, Guillaume Becker, Harmony Gorré, Sylvestre Dammico, Ariane Desselle, Dominique Egrise, Natacha Leroi, et al. 2017. « Nanofitin as a New Molecular-Imaging Agent for the Diagnosis of Epidermal Growth Factor Receptor Over-Expressing Tumors ». *Bioconjugate Chemistry* 28 (9): 2361-71. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00374>

Hamuro, Yoshitomo, Stephen J. Coales, Kathleen S. Molnar, Steven J. Tuske, et Jeffrey A. Morrow. 2008. « Specificity of Immobilized Porcine Pepsin in H/D Exchange Compatible Conditions ». *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM* 22 (7): 1041-46. <https://doi.org/10.1002/rcm.3467>.

Han, Chao, Weiguang Li, Chengyao Hua, Fengqing Sun, Pengsheng Bi, et Qunqing Wang. 2018. « Enhancement of Catalytic Activity and Thermostability of a Thermostable Cellobiohydrolase from *Chaetomium Thermophilum* by Site-Directed Mutagenesis ». *International Journal of Biological Macromolecules* 116 (septembre): 691-97. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.088>.

Handen, Benjamin L., Raun D. Melmed, Robin L. Hansen, Michael G. Aman, David L. Burnham, Jon B. Bruss, et Christopher J. McDougale. 2009. « A Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Oral Human Immunoglobulin for Gastrointestinal Dysfunction in Children with Autistic Disorder ». *Journal of Autism and Developmental Disorders* 39 (5): 796-805. <https://doi.org/10.1007/s10803-008-0687-y>.

Hubatsch, Ina, Eva G. E. Ragnarsson, et Per Artursson. 2007. « Determination of Drug Permeability and Prediction of Drug Absorption in Caco-2 Monolayers ». *Nature Protocols* 2 (9): 2111-19. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.303>.

Jantratid, Ekarat, Niels Janssen, Christos Reppas, et Jennifer B. Dressman. 2008. « Dissolution Media Simulating Conditions in the Proximal Human Gastrointestinal Tract: An Update ». *Pharmaceutical Research* 25 (7): 1663-76. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9569-4>.

Jarchi, Samaneh, Farangis Ataei, et Saman Hosseinkhani. 2018. « Mutation of Conserved Residues K329 and R330 on the Surface of Firefly Luciferase: Effect on Proteolytic Degradation ». *International Journal of Biological Macromolecules* 115 (août): 324-30. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.050>.

Jasion, Victoria S, et Bruce P Burnett. 2015. « Survival and Digestibility of Orally-Administered Immunoglobulin Preparations Containing IgG through the Gastrointestinal Tract in Humans ». *Nutrition Journal* 14 (1): 22. <https://doi.org/10.1186/s12937-015-0010-7>.

Kalichuk, Valentina, Ghislaine Béhar, Axelle Renodon-Cornière, Georgi Danovski, Gonzalo Obal, Jacques Barbet, Barbara Mouratou, et Frédéric

- Pecorari. 2016. « The Archaeal "7 KDa DNA-Binding" Proteins: Extended Characterization of an Old Gifted Family ». *Scientific Reports* 6: 37274. <https://doi.org/10.1038/srep37274>.
- Kaur, Navpreet, Ajit Narang, et Arvind Kumar Bansal. 2018. « Use of Biorelevant Dissolution and PBPK Modeling to Predict Oral Drug Absorption ». *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 129 (août): 222-46. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.05.024>.
- Kintzing, James R., Maria V. Filsinger Interrante, et Jennifer R. Cochran. 2016. « Emerging Strategies for Developing Next-Generation Protein Therapeutics for Cancer Treatment ». *Trends in Pharmacological Sciences* 37 (12): 993-1008. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.10.005>.
- Korte, Robin, Julia Bräcker, et Jens Brockmeyer. 2017. « Gastrointestinal Digestion of Hazelnut Allergens on Molecular Level: Elucidation of Degradation Kinetics and Resistant Immunoactive Peptides Using Mass Spectrometry ». *Molecular Nutrition & Food Research* 61 (10). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700130>.
- Leader, Benjamin, Quentin J. Baca, et David E. Golan. 2008. « Protein Therapeutics: A Summary and Pharmacological Classification ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 7 (1): 21-39. <https://doi.org/10.1038/nrd2399>.
- Lin, Alice V. 2015. « Direct ELISA ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1318: 61-67. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5_6).
- Liu, Weilin, Aiqian Ye, Wei Liu, Chengmei Liu, Jianzhong Han, et Harjinder Singh. 2015. « Behaviour of Liposomes Loaded with Bovine Serum Albumin during in Vitro Digestion ». *Food Chemistry* 175 (mai): 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.108>.
- Maeng, Han-Joo, Jin-Ha Yoon, Kwang-Hoon Chun, Sung Tae Kim, Dong-Jin Jang, Ji-Eun Park, Yang Hee Kim, Seong-Bo Kim, et Yu Chul Kim. 2019. « Metabolic Stability of D-Allulose in Biorelevant Media and Hepatocytes: Comparison with Fructose and Erythritol ». *Foods (Basel, Switzerland)* 8 (10). <https://doi.org/10.3390/foods8100448>.
- Merbel, Nico C. van de. 2019. « Protein Quantification by LC-MS: A Decade of Progress through the Pages of Bioanalysis ». *Bioanalysis* 11 (7): 629-44. <https://doi.org/10.4155/bio-2019-0032>.
- Miconai, Andrés, Frank Wien, Linda Kernya, Young-Ho Lee, Yuji Goto, Matthieu Réfrégiers, et József Kardos. 2015. « Accurate Secondary Structure Prediction and Fold Recognition for Circular Dichroism Spectroscopy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (24): E3095-3103. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500851112>.
- Minekus, M., M. Alminger, P. Alvito, S. Ballance, T. Bohn, C. Bourlieu, F. Carrière, et al. 2014. « A Standardised Static in Vitro Digestion Method Suitable for Food - an International Consensus ». *Food & Function* 5 (6): 1113-24. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>.
- Miranda, Frederico F., Elodie Brient-Litzler, Nora Zidane, Frédéric Pecorari, et Hugues Bedouelle. 2011. « Reagentless Fluorescent Biosensors from Artificial Families of Antigen Binding Proteins ». *Biosensors & Bioelectronics* 26 (10): 4184-90. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.04.030>.

Modesti, Mauro. 2011. « Fluorescent Labeling of Proteins ». In *Single Molecule Analysis: Methods and Protocols*, édité par Erwin J. G. Peterman et Gijs J. L. Wuite, 101-20. *Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-282-3\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-282-3_6).

Mouratou, Barbara, Francis Schaeffer, Ingrid Guilvout, Diana Tello-Manigne, Anthony P. Pugsley, Pedro M. Alzari, et Frédéric Pecorari. 2007. « Remodeling a DNA-Binding Protein as a Specific in Vivo Inhibitor of Bacterial Secretin PulD ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (46): 17983-88. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702963104>.

Niu, Canfang, Peilong Yang, Huiying Luo, Huoqing Huang, Yaru Wang, et Bin Yao. 2017. « Engineering the Residual Side Chains of HAP Phytases to Improve Their Pepsin Resistance and Catalytic Efficiency ». *Scientific Reports* 7: 42133. <https://doi.org/10.1038/srep42133>.

Niu, Xiaoyu, Inge A. M. de Graaf, et Geny M. M. Groothuis. 2013. « Evaluation of the Intestinal Toxicity and Transport of Xenobiotics Utilizing Precision-Cut Slices ». *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems* 43 (1): 73-83. <https://doi.org/10.3109/00498254.2012.729870>.

Otsuka, Keiichi, Yasushi Shono, et Jennifer Dressman. 2013. « Coupling Biorelevant Dissolution Methods with Physiologically Based Pharmacokinetic Modelling to Forecast In-Vivo Performance of Solid Oral Dosage Forms ». *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 65 (7): 937-52. <https://doi.org/10.1111/jphp.12059>.

Pacheco, Sabino, Ghislaine Béhar, Mike Maillason, Barbara Mouratou, et Frédéric Pecorari. 2014. «

Affinity Transfer to the Archaeal Extremophilic Sac7d Protein by Insertion of a CDR ». *Protein Engineering, Design & Selection: PEDS* 27 (10): 431-38. <https://doi.org/10.1093/protein/gzu042>.

Pecorari, Frédéric, et Pedro Alzari. 2008. *Ob-Fold Used as Scaffold for Engineering New Specific Binders*, issued 12 juin 2008. <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?sessionId=C61B13D792F1CA6A142ECB5B4D973B95.wapp2nB?docId=WO2008068637&tab=PCTDESCRPTION>.

Reis, J. M., B. Sinkó, et C. H. R. Serra. 2010. « Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) - Is It Better than Caco-2 for Human Passive Permeability Prediction? ». *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 10 (11): 1071-76. <https://doi.org/10.2174/1389557511009011071>.

Richter, C., T. Tanaka, et R. Y. Yada. 1998. « Mechanism of Activation of the Gastric Aspartic Proteinases: Pepsinogen, Progastricsin and Prochymosin ». *The Biochemical Journal* 335 (Pt 3) (novembre): 481-90. <https://doi.org/10.1042/bj3350481>.

Roesler, K. R., et A. G. Rao. 2001. « Rapid Gastric Fluid Digestion and Biochemical Characterization of Engineered Proteins Enriched in Essential Amino Acids ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (7): 3443-51. <https://doi.org/10.1021/jf010209b>.

Rubio, Carlos A. 2015. « Increased Production of Lysozyme Associated with Bacterial Proliferation in Barrett's Esophagitis, Chronic Gastritis, Gluten-Induced Atrophic Duodenitis (Celiac Disease), Lymphocytic Colitis, Collagenous Colitis, Ulcerative Colitis and Crohn's Colitis ». *Anticancer Research* 35 (12): 6365-72.

- Sherly Carolyn, Justin, Daniel Selva Raj, Balasubramanian Malaikozhundan, Marimuthu Govindarajan, Naiyf S. Alharbi, Shine Kadaikunnan, Jamal M. Khaled, Mohammed N. Al-Anbr, Ahmed S. Alobaidi, et Baskaralingam Vaseeharan. 2019. « Anti-Cancer, Anti-Biofilm, and Anti-Inflammatory Properties of Hen's Albumen: A Photodynamic Approach ». *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 28 (décembre): 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.07.026>.
- Shimazaki, Youji, et Ayumi Takahashi. 2018. « Antibacterial Activity of Lysozyme-Binding Proteins from Chicken Egg White ». *Journal of Microbiological Methods* 154 (novembre): 19-24. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.10.001>.
- Simeon, Rudo, et Zhilei Chen. 2018. « In Vitro-Engineered Non-Antibody Protein Therapeutics ». *Protein & Cell* 9 (1): 3-14. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0386-6>.
- Škrlec, Katja, Borut Štrukelj, et Aleš Berlec. 2015. « Non-Immunoglobulin Scaffolds: A Focus on Their Targets ». *Trends in Biotechnology* 33 (7): 408-18. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.03.012>.
- Taylor, Sean C., Thomas Berkelman, Geetha Yadav, et Matt Hammond. 2013. « A Defined Methodology for Reliable Quantification of Western Blot Data ». *Molecular Biotechnology* 55 (3): 217-26. <https://doi.org/10.1007/s12033-013-9672-6>.
- Tu, Tao, Yuan Wang, Huoqing Huang, Yaru Wang, Xiao Jiang, Zhenxing Wang, Bin Yao, et Huiying Luo. 2019. « Improving the Thermostability and Catalytic Efficiency of Glucose Oxidase from *Aspergillus Niger* by Molecular Evolution ». *Food Chemistry* 281 (mai): 163-70. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.099>.
- Vukojicic, Petar, Ghislaine Béhar, Maun H. Tawara, Marcos Fernandez-Villamarin, Frédéric Pecorari, Eduardo Fernandez-Megia, et Barbara Mouratou. 2019. « Multivalent Affidendrons with High Affinity and Specificity toward *Staphylococcus Aureus* as Versatile Tools for Modulating Multicellular Behaviors ». *ACS Applied Materials & Interfaces* 11 (24): 21391-98. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b05702>.
- Walsh, Gary. 2018. « Biopharmaceutical Benchmarks 2018 ». *Nature Biotechnology* 36 (12): 1136-45. <https://doi.org/10.1038/nbt.4305>.
- Weidle, Ulrich H., Johannes Auer, Ulrich Brinkmann, Guy Georges, et Georg Tiefenthaler. 2013. « The Emerging Role of New Protein Scaffold-Based Agents for Treatment of Cancer ». *Cancer Genomics & Proteomics* 10 (4): 155-68.

## Chapitre 2 : Exposition orale des herbicides et de leurs métabolites

### 1. Préambule

La première fonction de l'épithélium intestinal est d'agir comme une barrière physique pour empêcher le passage d'éléments nocifs : antigènes étrangers, micro-organismes et leurs toxines. Il agit, en second lieu, comme filtre sélectif, permettant le passage de nutriments essentiels ou d'électrolytes, de la lumière intestinale vers la circulation systémique. Les jonctions cellulaires épithéliales sont les principales composantes de la barrière intestinale car elles relient les cellules épithéliales entre elles, fonctionnant comme un véritable système de « clôture ».

Des molécules peuvent altérer le bon fonctionnement de la barrière intestinale. Les herbicides, par exemple, sont connus chez les animaux aquatiques pour être un facteur d'altération physiologique (Vonk et Kraak 2020). Les sources d'exposition multiples, par l'alimentation, l'air et par les réseaux d'acheminement de l'eau, ont été décrites dans des revues (Agostini et al. 2020). Récemment le glyphosate a été décrit comme un acteur de l'hyperperméabilité intestinale à forte concentration (Vasiluk, Pinto, et Moore 2005). D'autres herbicides présents en fortes concentrations dans les eaux de boissons sont, à l'inverse, moins étudiés. C'est pourquoi, il est intéressant de mettre en place des modèles simples et reproductibles pour rechercher les effets des herbicides sur l'Homme suite à une exposition aiguë ou prolongée. Notre intérêt s'est porté sur deux herbicides et leurs métabolites : le métolachlore et l'atrazine. Etudier l'impact de l'atrazine et du métolachlore ainsi que de leurs métabolites sur la barrière intestinale soulève un ensemble d'interrogations. Les herbicides ont-ils un effet sur les cellules intestinales ? Y a-t-il une variabilité des effets au cours d'une exposition aiguë ou chronique ? Y a-t-il un impact différent entre des expositions à doses faibles et élevées ? Les effets sont-ils plus importants entre une exposition unique ou en cocktail ? Quelle est la différence entre la molécule mère et ses métabolites ?

## 2. Résultats

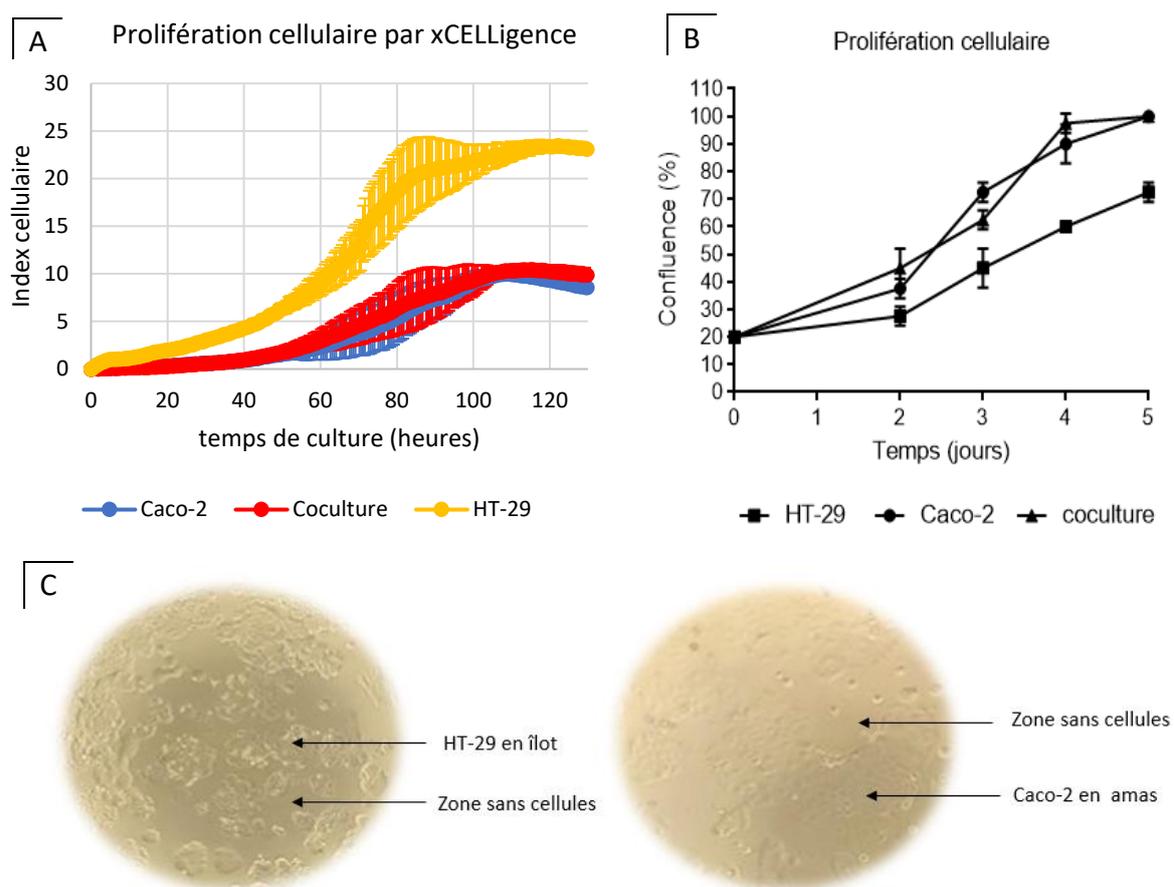
### 2.1. Caractérisation du modèle cellulaire

Nous avons souhaité tester deux lignées cellulaires intestinales pour réaliser un modèle d'étude simple et reproductible. En nous basant sur les lignées de référence dans les études de perméabilité cellulaire, nous avons testé les cellules d'adénocarcinome de côlon Caco-2 et HT-29 seules ou en coculture.

#### 2.1.1. Prolifération et adhésion cellulaires

Le système xCELLigence permet de suivre des événements cellulaires en temps réel en mesurant l'impédance électrique à l'aide de microélectrodes situées au fond de chaque plaque de culture cellulaire. Un logiciel RTCA calcule un indice cellulaire (IC) qui correspond au changement relatif de l'impédance mesurée pour représenter l'état des cellules à un instant  $t$ . Nous avons comparé le profil des cellules Caco-2, HT-29 et de la coculture sur 130 h.

Les profils de prolifération étaient similaires entre les trois conditions de culture : une phase d'initiation entre 5 h et 40 h, une phase exponentielle entre 50 h et 100 h et un plateau au-delà de 100 h (Figure 56A). Malgré un profil similaire, nous avons eu un IC max différent entre les cellules HT-29 (IC max= 23) et les cellules Caco-2 (IC max= 10). Nous avons noté qu'une coculture avec un ratio Caco-2/HT-29 (9 :1) ne présentait de différence de ICmax avec une monoculture Caco-2. Etant donné que l'IC tient compte du nombre, de la taille et de la force d'adhésion des cellules, nous avons donc eu une différence significative de la prolifération entre HT-29 et Caco-2. Nous savions que les cellules HT-29 et Caco-2 avaient une morphologie cellulaire différente. En effet, les cellules HT-29 sont petites, rondes et homogènes tandis que les Caco-2 sont très hétérogènes en taille. De plus, les Caco-2 s'étalent sur la surface lorsqu'elles adhèrent, contrairement aux HT-29 qui forment des îlots (Figure 56C). Pour caractériser cette différence entre Caco-2 et HT-29, un comptage cellulaire a été réalisé sur 5 jours. L'indicateur du pourcentage de confluence nous a montré que les cellules Caco-2 et la coculture atteignent la confluence plus rapidement que les cellules HT-29. A jour 5, les Caco-2 étaient à 100 % de confluence tandis que les cellules HT-29 étaient à 70 % (Figure 56B). Le nombre de cellules à jour 5 était pourtant deux fois plus important pour les cellules HT-29 (résultats non montrés). Enfin, l'écart du temps de culture à IC  $\frac{1}{2}$  entre les 2 lignées cellulaires était de 24 h.



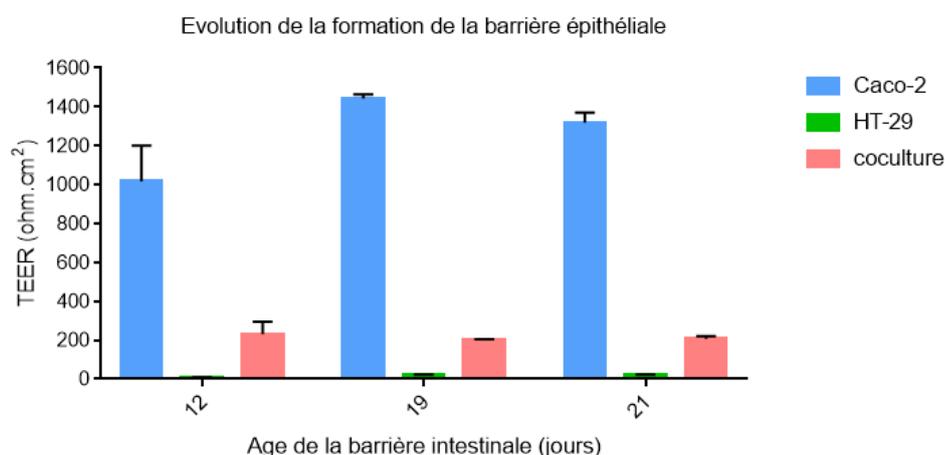
**Figure 56.** Caractéristiques cellulaires des cellules épithéliales intestinales

**A)** Mesure de l'index cellulaire, par xCELLigence, des cellules Caco-2 et HT-29 cultivées seules ou en coculture (ratio 9 :1). Les mesures représentent la moyenne et Ecart-type (ET) de duplicats techniques **B)** Prolifération cellulaire exprimée en pourcentage de confluence suite à une observation au microscope au grossissement X10. Les mesures représentent la moyenne et ET de duplicats techniques **C)** Organisation et morphologie lors de la culture de Caco-2 et HT-29.

### 2.1.2. Formation de la perméabilité cellulaire

Un paramètre important à contrôler dans notre étude est la capacité des lignées à former une barrière polarisée et semi-perméable, c'est pourquoi nous avons mis en culture ces 2 lignées seules ou en coculture, sur des inserts Transwell, pendant 21 jours. Seuls les modèles ayant une valeur de résistance électrique transépithéliale (TEER)  $>250 \text{ ohm.cm}^2$  pendant la différenciation peuvent être utilisés pour des études de perméabilité cellulaire (Srinivasan et al. 2015). Le suivi de la TEER nous apprend que les valeurs sont très différentes en fonction du modèle (Figure 57). Les inserts avec des cellules HT-29 ont des valeurs faibles ( $25 \text{ ohm.cm}^2$ ), tout comme les cocultures ( $\sim 250 \text{ ohm.cm}^2$ ). D'après ces valeurs, la coculture peut être utilisée

comme modèle bien que les valeurs soient plus faibles que celles des inserts avec Caco-2 (~1500 ohm.cm<sup>2</sup>).

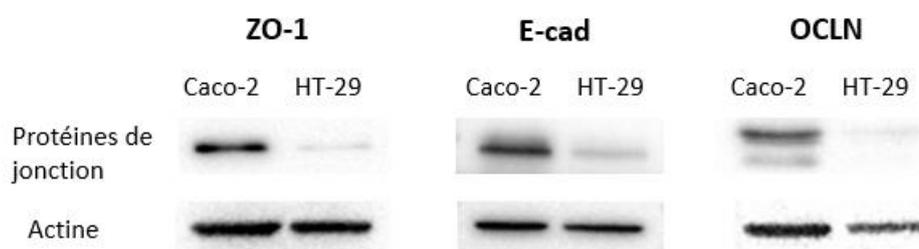


**Figure 57.** Formation de la barrière épithéliale en fonction de la lignée cellulaire

Mesure de la TEER au cours de la culture sur des inserts Transwell pendant 21 jours. Les résultats sont exprimés en moyenne et ET de 4 réplicats techniques.

### 2.1.3. Expression protéique des jonctions cellulaires

La perméabilité cellulaire est modulée par des protéines de jonction. En nous intéressant à l'expression des protéines de zonula occludens (ZO-1), E-cadhérine (E-cad) et Occludine (OCLN), nous avons remarqué une plus forte expression de ces dernières chez Caco-2 comparé à HT-29, après normalisation avec l'actine (Figure 58). Ce paramètre est particulièrement important puisque dans le cadre de l'évaluation des effets des herbicides sur la perméabilité membranaire, nous devons être en mesure de suivre l'expression des protéines de jonction.



**Figure 58.** Expression des protéines de jonction en fonction de la lignée cellulaire

Western-blot réalisé avec 50 µg de protéines totales extraites d'un échantillon de 2x10<sup>6</sup> cellules d'une lignée Caco-2 ou HT-29. Protéines de jonction Zonula Occludens (ZO-1), E-cadhérine (E-cad), Occludine (OCLN) et le témoin actine.

Les conditions standard d'extraction et de Western-blot n'ont pas permis de visualiser la claudine-1 (CL-1). La trypsine-EDTA, habituellement utilisée dans les études d'expression protéique par Western-blot, est une protéase contenue dans les cellules qui associée à l'EDTA élimine l'adhérence cellule à cellule. Les cellules Caco-2 mettent du temps à se détacher or, en prolongeant l'incubation, la trypsine peut endommager les protéines à la surface des cellules et détruire les protéines de jonction. Une solution plus douce comme la Versène (une solution d'EDTA) augmente la concentration en protéines totales extraites d'un facteur 2 (Tableau 10). Une autre solution contenant un mélange de trypsine et de collagénase à faible concentration (accutase) a été testée mais ne donne pas de meilleurs résultats que la trypsine.

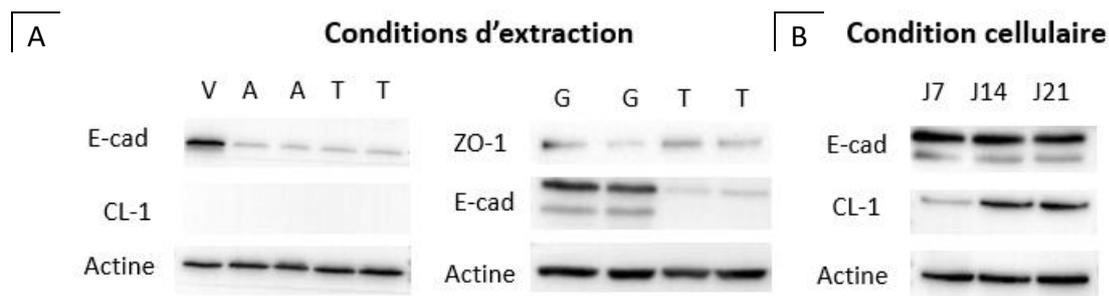
**Tableau 10.** Concentration en protéine totale en fonction de la méthode d'extraction protéique.

	Méthode chimique			Méthode physique		
	Trypsine*	Accutase*	Versène*	7j**	14j**	21j**
Conc. mg/mL	3,6 ± 0,15	3,4 ± 0,07	6,6 ± 0	3,3 ± 0	4,6 ± 0,16	7,2 ± 0,18

\* réalisée sur des culots cellulaires de 2 millions de cellules

\*\* réalisée dans des plaques 6 puits

Ayant rencontré des obstacles pour visualiser la CL-1, une optimisation des protocoles a donc été nécessaire. Les essais avec des solutions d'extraction plus douces (versène et accutase) ayant été infructueux, nous avons testé une méthode alternative « physique » en grattant directement les cellules dans le tampon d'extraction contenant des antiprotéases (Figure 59A). Bien que nous n'ayons toujours pas obtenu de réponse satisfaisante pour la CL-1, il est apparu que l'E-cad était mieux conservée. En déposant 50 µg de protéines totales sur un gel, nous observons une bande E-cad de plus forte intensité avec la solution de versène par rapport aux bandes d'intensité égale entre la trypsine et l'accutase (Figure 59A). La méthode de décollement physique par grattage conduit à l'apparition de bandes plus intenses par rapport à la méthode par trypsine et qui correspondent à la forme immature (130 kDa) et à la forme mature (120 kDa) de l'E-cad.



**Figure 59.** Optimisation des conditions d'extraction

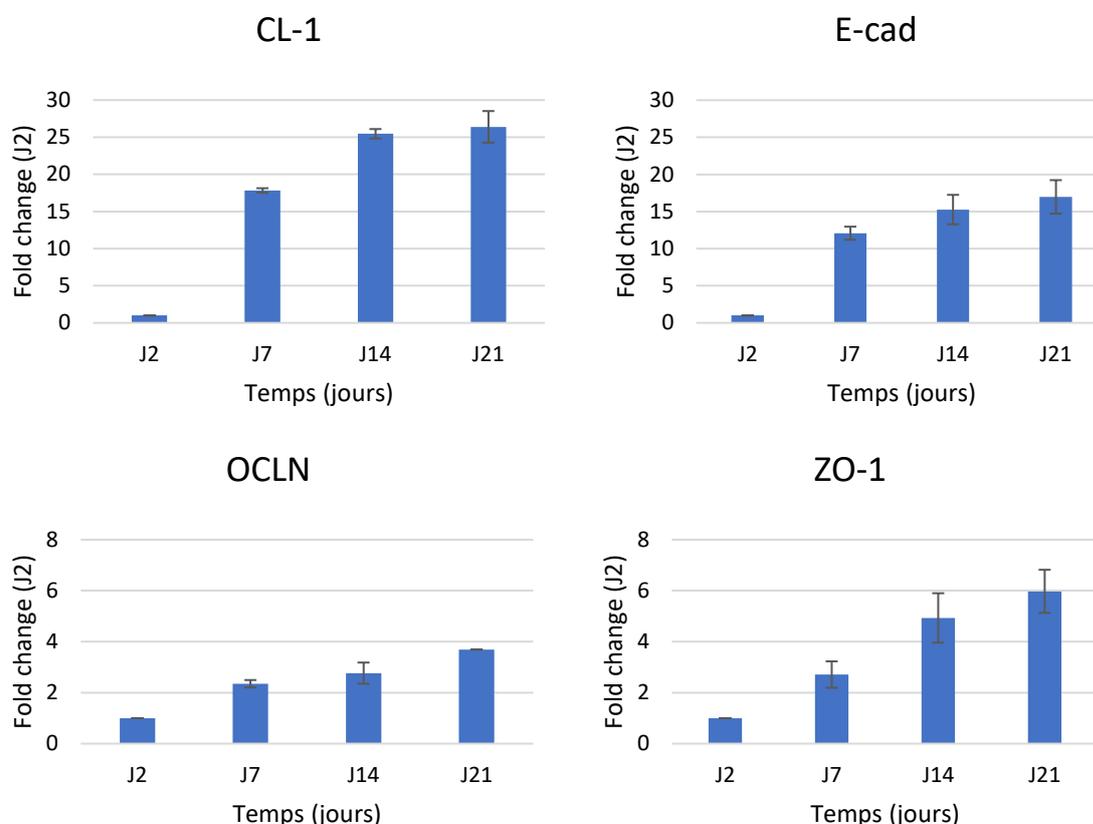
Western-blot réalisé avec 50 µg de protéines totales extraites d'un échantillon de  $2 \times 10^6$  cellules d'une lignée Caco-2. Protéines de jonction ZO-1, E-cad, CL-1, OCLN et le témoin actine. **A)** Comparaison des conditions d'extractions par décollage chimique des cellules (V : Versène, A : Accutase, T : Trypsine) ou décollage physique par grattage (G). **B)** Comparaison de l'effet de la durée de formation de la barrière (7 - 14 -21 jours de culture) sur l'expression de CL-1 et E-cad.

La CL-1 n'est pas visible dans les conditions précédemment testées, nous avons alors émis l'hypothèse qu'elle ne devait pas être exprimée en l'absence de « barrière ». Nous avons donc choisi de faire varier le temps de culture des cellules Caco-2. Nous observons que l'intensité des bandes de CL-1 augmente entre une barrière constituée en 7, 14 et 21 jours (J7 < J14 < J21). Il apparaît que l'expression de la CL-1 augmente proportionnellement à la durée de formation de la barrière (Figure 59B). Par comparaison, L'E-cad, semble être exprimée de façon stable au cours du temps.

#### 2.1.4. Expression des gènes codant pour les protéines de jonction

Une caractérisation plus fine de l'expression des jonctions serrées et adhérentes a été réalisée par RT-qPCR. Les résultats obtenus vont dans le même sens que les observations protéiques, c'est-à-dire que l'expression du gène codant pour la CL-1 augmente au cours de la formation de la barrière épithéliale (Figure 60). L'expression du gène de *CL-1* est  $18 \pm 0,3$  fois plus forte à J7 qu'à J2. Entre J14 et J21 l'expression est identique avec une augmentation d'un facteur de  $26 \pm 1,3$  par rapport à J2. Un résultat similaire est retrouvé pour les gènes codant pour OCLN, ZO-1 et E-cad avec des taux d'expression variables. Notons ici, la différence entre l'expression des ARNm et des protéines pour l'E-cad. Dans le cas de l'expression protéique, l'E-cad est constante au cours de la formation de la barrière. Dans le cas de l'expression génique, l'ARNm codant pour E-cad augmente en fonction de l'âge de la barrière.

D'après ces informations, nous savons qu'il faut une barrière au minimum de 14 jours pour avoir l'ensemble des protéines de jonction correctement formée.



**Figure 60.** Expression des gènes codant pour les protéines de jonction

RT-qPCR réalisée avec des échantillons d'ARN extraits de cellules Caco-2 cultivées pendant 2, 7, 14 et 21 jours. Les graphiques sont représentés en fold change par rapport au jour 2 et normalisés par rapport à l'actine. Les résultats sont exprimés en moyenne et ET de duplicats techniques.

## 2.2. Evaluation des effets cellulaires des herbicides

### 2.2.1. Viabilité cellulaire

Lors du trajet dans le tractus digestif, les herbicides, s'ils ne sont pas dégradés, vont être en contact avec l'épithélium intestinal. Evaluer la toxicité de ces composés sur une gamme de concentration étendue est donc important. Nous avons souhaité tester la cytotoxicité des herbicides en regardant la diminution de l'activité métabolique par un test MTT (activité mitochondriale) et un test ATP (voie de signalisation cellulaire). Il s'avère que dans le test ATP, les herbicides engendrent une cytotoxicité inférieure à 10 % (Figure 61). Moins de 10 % de

cytotoxicité sur l'ensemble de la gamme indique que les herbicides n'ont pas d'effet sur la voie de signalisation ATP dans la lignée Caco-2.

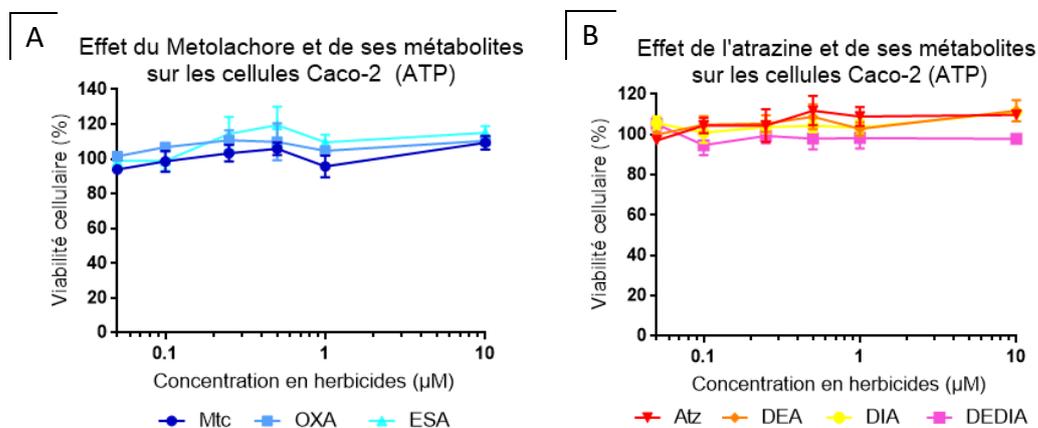


Figure 61. Test ATP évaluant la viabilité cellulaire des Caco-2 exposées à des herbicides

Des cellules Caco-2 sont exposées 24 h à une concentration croissante 0,05-0,1-0,25-0,5-1 et 10 µM de **A)** Mtc, OXA et ESA **B)** Atz, DEA, DIA et DEDIA. Les graphiques sont représentés sur l'axe des ordonnées : en pourcentage de viabilité calculé par rapport à la viabilité des cellules sans traitement et en présence de DMSO 20 % qui entraîne 100 % de toxicité cellulaire; et sur l'axe des abscisses : en échelle log de 10. Les résultats sont exprimés en moyenne et ET de 4 réplicats biologiques.

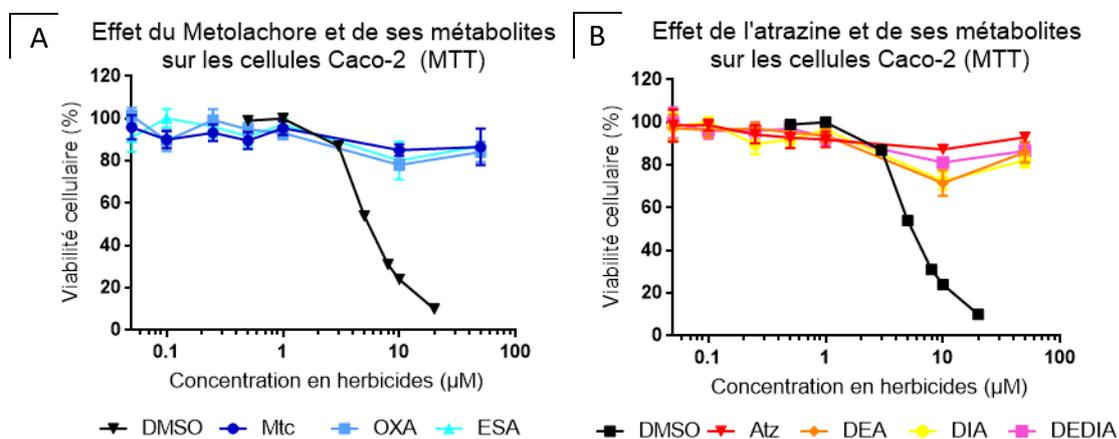


Figure 62. Test MTT évaluant de la viabilité cellulaire des Caco-2 exposées à des herbicides.

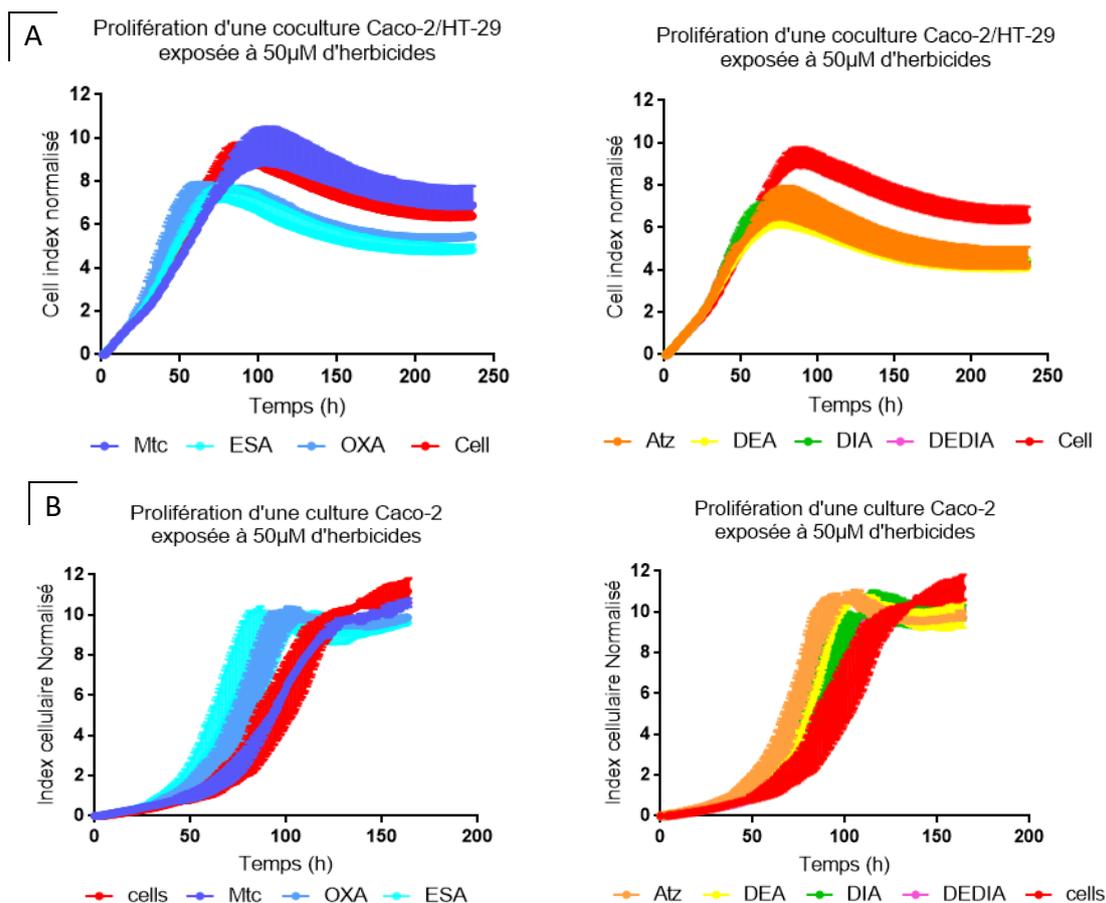
Des cellules Caco-2 sont exposées 24 h à une concentration croissante 0,05-0,1-0,25-0,5-1-10 et 50 µM en herbicides : **A)** Mtc, OXA et ESA **B)** Atz, DEA, DIA et DEDIA. Les graphiques sont représentés sur l'axe des ordonnées : en pourcentage de viabilité calculé par rapport à la viabilité des cellules sans traitement et en présence de DMSO 20 % qui entraîne 100 % de toxicité cellulaire; et sur l'axe des abscisses : en échelle log de 10. Une gamme de DMSO (0-0,5-1-3-6-10 et 20 %) sert de témoin de toxicité.

Les tests MTT montrent une diminution de la viabilité cellulaire inférieure à 15 % entre 0,05  $\mu\text{M}$  et 1  $\mu\text{M}$  mais une augmentation de la cytotoxicité de 20 à 25 % à 10  $\mu\text{M}$  pour le Mtc, l'Atz et leurs métabolites (Figure 62). Les faibles effets observés sont dose-dépendants mais ne suivent pas une variation continue avec la dose. La viabilité cellulaire est meilleure à 50  $\mu\text{M}$  qu'à 10  $\mu\text{M}$  et le point à 0,5  $\mu\text{M}$  présente une toxicité légèrement supérieure à celle de 1  $\mu\text{M}$ . La gamme de DMSO, utilisé comme témoin, nous confirme que plus le pourcentage en DMSO augmente et plus la viabilité cellulaire diminue.

### 2.2.2. Prolifération et adhésion cellulaires

Les herbicides ont ensuite été évalués sur leur capacité potentielle à agir au niveau de la prolifération cellulaire. Les expériences ont été menées sur un modèle de monoculture Caco-2 et de coculture Caco-2/HT-29 avec un ratio 9:1. Les résultats xCELLigence montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les cellules Caco-2 ou Caco-2/HT-29 non traitées et traitées aux Mtc 50  $\mu\text{M}$  (Figure 63). Pour les autres herbicides, nous retrouvons dans les 2 modèles de culture une augmentation de la prolifération/adhésion qui se traduit soit par une phase plateau atteinte plus rapidement, soit par un décalage de la phase exponentielle de la droite vers la gauche. Les plateaux pour les cellules Caco-2/HT-29 en coculture sont atteints plus rapidement par les métabolites du Mtc (50 h) ainsi que par l'Atz (80 h) et ses métabolites (~70 h) par rapport aux cellules non traitées (100 h) (Figure 63A). D'après notre précédente étude, l'IC max correspond à la force d'adhésion et au nombre de cellules. Bien que les vitesses de prolifération semblent similaires, les diminutions des IC max de ESA, OXA, Atz, DEA, DIA et DEDIA par rapport aux cellules sans traitement suggèrent que le nombre de cellules détectées est lui inférieur ou la force d'adhésion plus faible.

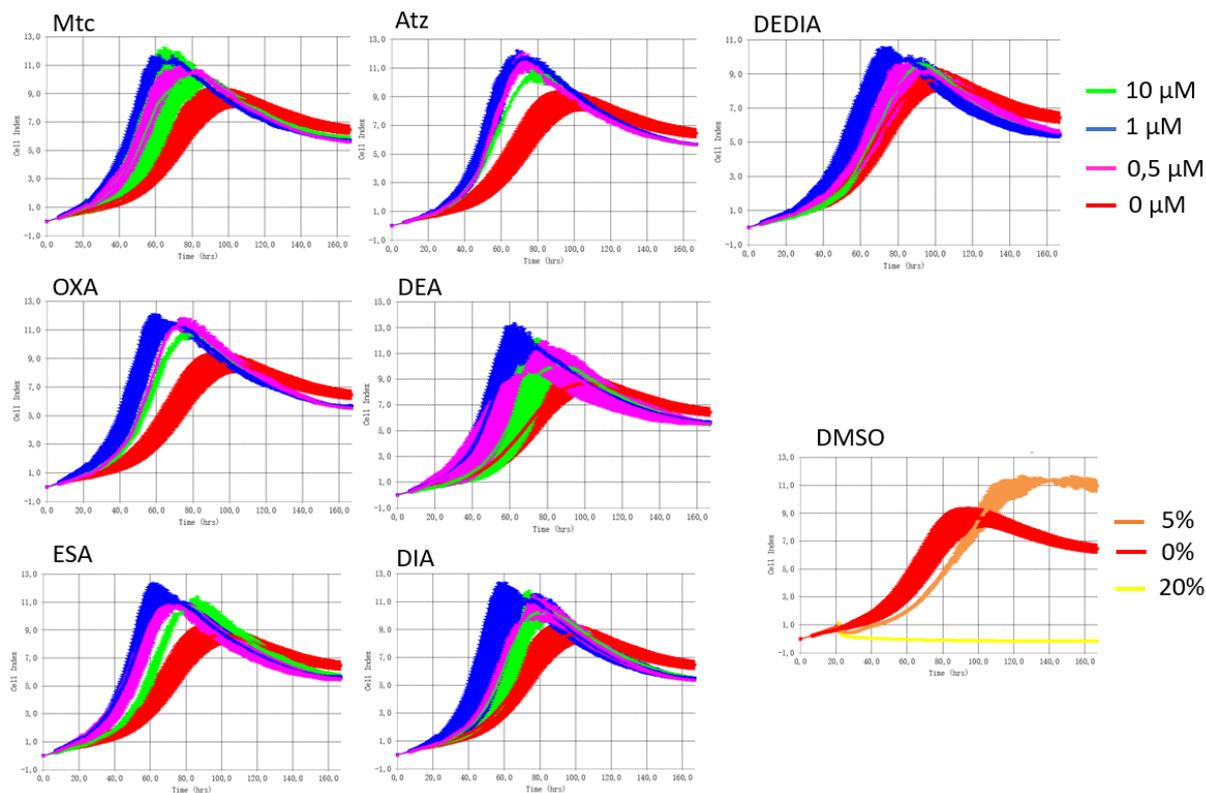
Concernant les cellules en monoculture traitées ou non avec les herbicides, pour évaluer la différence de prolifération/adhésion, il est nécessaire de regarder le  $\text{TE}_{50}$  (temps de prolifération à 50 % du  $\text{IC}_{\text{max}}$ ). La diminution du  $\text{TE}_{50}$  est corrélée à une augmentation de la vitesse de la prolifération. Nous retrouvons donc une augmentation pour l'ESA ( $\text{TE}_{50} = 60$  h), l'OXA ( $\text{TE}_{50} = 70$  h) et dans une plus faible mesure pour l'Atz et ses métabolites ( $\text{TE}_{50}$  entre 60 et 80 h) par rapport aux cellules non traitées où le  $\text{TE}_{50}$  est à 100 h (Figure 63B).



**Figure 63.** Comparaison des effets des herbicides à 50 µM sur la prolifération d’une monoculture Caco-2 et coculture Caco-2/HT-29

- A)** Exposition d’une coculture Caco-2/HT-29 (ratio 9 :1) au Mtc et ses métabolites et à l’Atz et ses métabolites.
- B)** Exposition d’une monoculture Caco-2 au Mtc et ses métabolites et à l’Atz et ses métabolites. Les graphiques xCELLigence sont réalisés en moyenne et ET de 2 réplicats techniques représentatifs de plusieurs expériences.

En regardant plus précisément les effets de la concentration en herbicides sur une monoculture Caco-2, nous remarquons qu’il y a une légère relation effet-dose. En effet, nous observons un effet légèrement plus important avec 1 µM d’herbicides qu’avec 0,5 µM. Par contre, il semble qu’il y ait moins d’effet avec la forte concentration 10 µM (Figure 64). Un contrôle supplémentaire a été effectué avec 5 et 20 % de DMSO. Nous avons bien une diminution significative du nombre de cellules avec 20 % de DMSO et un retard de la prolifération avec 5 % de DMSO (120 h au lieu de 100 h).



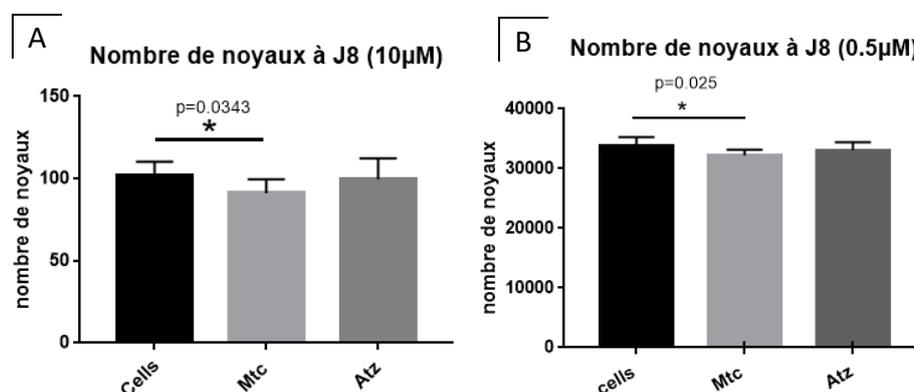
**Figure 64.** Effet de la concentration en herbicides sur la prolifération cellulaire des Caco-2

Une gamme de 0-0,5-1 et 10 µM d’herbicides et de 0-5 et 20 % de DMSO sont déposés sur les cellules Caco-2. Les graphiques xCELLigence sont réalisés en moyenne et ET de 2 réplicats techniques représentatifs de 5 expériences distinctes.

Dans leur cycle de prolifération, les cellules vont d’abord adhérer (phase d’initiation), se multiplier (phase exponentielle), puis atteindre un équilibre (phase de plateau). Au cours du temps, les cellules vont puiser dans les ressources du milieu jusqu’à leur épuisement, entraînant un déclin du nombre de cellules (phase de mort cellulaire). Le métabolisme des cellules est donc différent en fonction des phases. Le métabolisme en phase de plateau sera plus lent qu’en phase exponentielle. Les effets que nous constatons au niveau de la phase exponentielle laissent à penser que les herbicides pourraient avoir un léger impact sur le métabolisme des cellules Caco-2, modifiant ainsi certaines de leurs caractéristiques cellulaires et leur profil d’adhésion sur les plaques xCELLigence.

Nous avons ensuite réalisé un marquage des noyaux au DAPI pour évaluer le nombre de cellules au moment de la phase de plateau. Un traitement aigu d’une durée de 24 h à forte concentration (10 µM) a été réalisé sur une culture de 8 jours. Le comptage des noyaux colorés montre qu’il y a une différence entre les cellules traitées au Mtc et celles non traitées. Les

cellules traitées au Mtc 10  $\mu\text{M}$  ont une diminution du nombre de cellules (Figure 65A). Cette même expérience a été réalisée, cette fois, avec un traitement aigu de 24 h à faible concentration (0,5  $\mu\text{M}$ ) sur une culture de 8 jours. Une fois encore, nous remarquons une diminution du nombre de noyaux pour la condition traitée aiguë au Mtc (Figure 65B).



**Figure 65.** Comptage des noyaux marqués en immunofluorescence

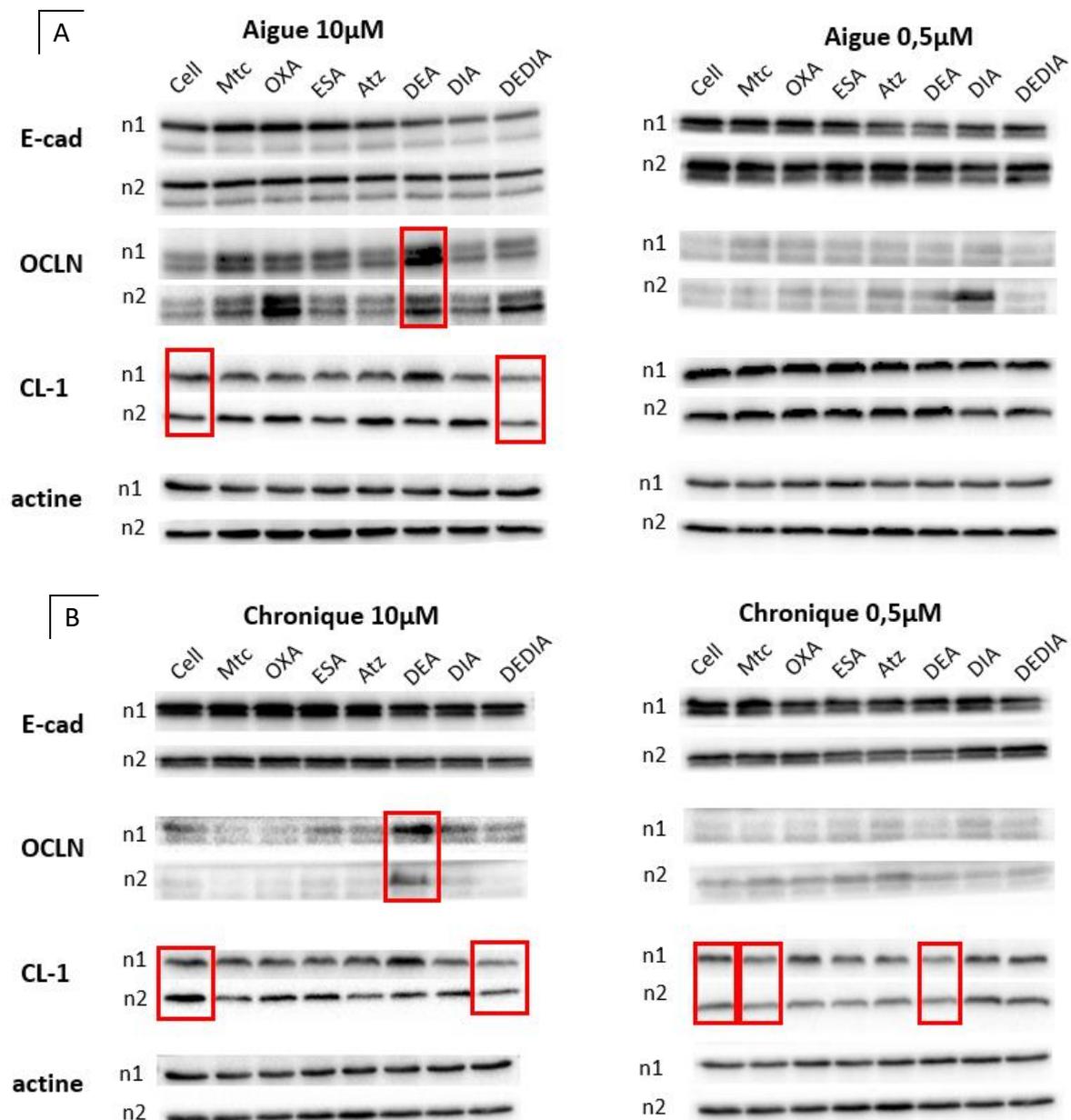
Marquage des noyaux au DAPI sur des cultures de Caco-2 traitées ou non avec du Mtc ou Atz en aiguë. **A)** immunomarquage après 8 jours de culture et une exposition aiguë à forte concentration (10  $\mu\text{M}$ ). **B)** Immunomarquage après 8 jours de culture et une exposition aiguë à faible concentration (0,5  $\mu\text{M}$ ). Comptage utilisant le logiciel Harmony. Les graphiques sont représentés en moyenne et ET de 12 champs de 4 réplicats biologiques, à l'objectif X63 air (A) et X10 air (B) de l'Operetta.

## 2.3. Evaluation des effets des herbicides sur les jonctions cellulaires

### 2.3.1. Evaluation de l'expression protéique

La barrière intestinale est composée de protéines de jonction. Elles assurent la cohésion entre les cellules et régulent le passage des molécules au travers des cellules épithéliales. Une exposition de ces herbicides sur des barrières constituées en plaque 6 puits sur 14 jours montre des effets différents selon la protéine de jonction et la concentration de l'herbicide (Figure 66). Une exposition à une faible concentration (0,5  $\mu\text{M}$ ) qu'elle soit aiguë ou chronique n'entraîne pas d'effet visible sur les protéines de jonction E-cad et OCLN avec le Western-blot. A l'inverse, des effets sont visibles lors d'une exposition aiguë à une forte concentration (10  $\mu\text{M}$ ) avec la modification de l'expression protéique de l'OCLN et de la CL-1 (carrés rouges) mais aucun effet n'est visible sur l'E-cad. L'OCLN est principalement sur-exprimée en présence des métabolites de l'Atz (DEA et DEDIA) ainsi que du Mtc et de ses deux métabolites (OXA et

ESA). La CL-1 est sous exprimée en présence de DEDIA. Dans le cas d'une exposition chronique avec une forte concentration, nous retrouvons à nouveau les mêmes résultats que précédemment, c'est-à-dire un effet de surexpression de l'OCLN par le DEA et un effet de sous-expression de la CL-1 par DEDIA.



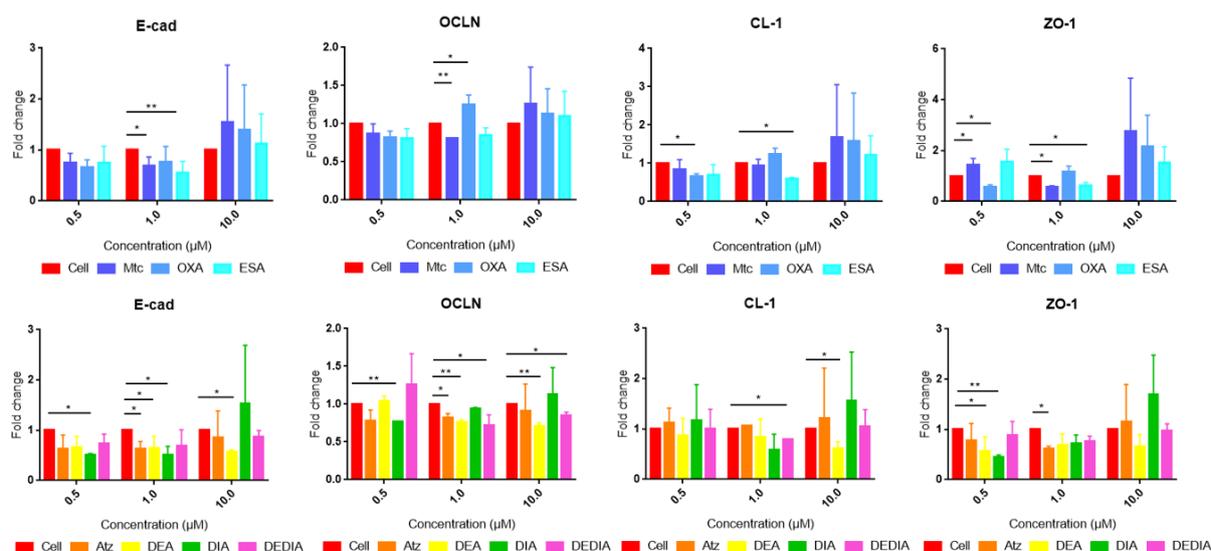
**Figure 66.** Expression des protéines de jonction suite à une exposition aiguë et chronique aux herbicides

Western-blot réalisé avec 50 μg de protéines totales extraites d'un échantillon d'une lignée Caco-2. Protéines de jonction E-cad, CL-1, OCLN et le témoin actine. **A)** Conditions aiguës. Les cellules sont exposées ou non à 0,5 ou 10 μM d'herbicides pendant 24 h, après 14 jours de culture. **B)** Condition chroniques. Les cellules sont exposées ou non à 0,5 ou 10 μM d'herbicides pendant les 14 jours de culture. Les résultats montrent les réplicats biologiques (n1, n2) de chaque condition.

Les expériences visant à évaluer l'expression des protéines de jonction sont à moduler. A ce stade du projet, nous ne pouvons pas apporter de réponse solide quant à la sur ou sous-expression de certains polluants sur les cellules Caco-2, notamment dans le cas de la jonction serrée OCLN. Plusieurs points d'améliorations ont été réfléchis pour comprendre la faible reproductibilité des résultats dans les conditions aiguës 0,5  $\mu\text{M}$  et chroniques. Nous avons constaté une dégradation progressive de nos échantillons dans le temps. Par exemple, l'OCLN qui a un poids moléculaire de 65 kDa n'est plus visible par contre nous détectons des bandes inférieures à 50 kDa.

### 2.3.2. Evaluation de l'expression génique

L'expression des gènes codant pour les protéines de jonction a été analysée par RT-qPCR à la suite d'une exposition chronique sur 14 jours. Les effets retrouvés sont faibles et varient selon l'herbicide et la concentration. Lorsque l'on s'intéresse aux molécules mères, nous constatons qu'elles n'ont d'effet qu'à 1  $\mu\text{M}$  (Figure 67).



**Figure 67.** Expression des ARNm codants pour les protéines de jonction suite à une exposition chronique aux herbicides

RT-qPCR réalisée avec des extraits d'ARN d'une culture de Caco-2 exposée durant 14 jours aux herbicides. Les résultats sont exprimés en Fold Change par rapport aux cellules non traitées et normalisés par rapport à l'actine. Les graphiques représentent la moyenne et ET de 3 réplicats biologiques. Les astérisques représentent les moyennes significativement différentes de la condition témoin cellules sans traitements ( $p$ -value < 0.05) avec un t-test.

Le Mtc diminue l'expression génique de l'E-cad, l'OCLN et de ZO-1. L'Atz diminue l'expression des gènes de l'OCLN et l'E-cad. Le métabolite ESA semble avoir un effet à 1  $\mu$ M sur les gènes de E-cad, CL-1 et ZO-1 alors que le métabolite OXA diminue l'expression des gènes ZO-1 et CL-1 à 0,5  $\mu$ M mais agit également en augmentant l'expression du gène OCLN à 1  $\mu$ M. Le métabolite de l'atrazine DEA diminue l'expression des gènes codant pour E-cad et OCLN à 1  $\mu$ M. Le métabolite DIA montre un effet à 0,5  $\mu$ M sur les gènes codant pour l'E-cad, l'OCLN et ZO-1. Enfin, le dernier métabolite DEDIA montre une sous-expression du gène de la CL-1 et de l'OCLN à 1  $\mu$ M, et de l'OCLN à 0,5  $\mu$ M. Tous ces résultats pris dans leur ensemble, d'une part ne montrent pas de tendance d'effet-dose et d'autre part sont à nuancer en raison de la faible variation du fold change (inférieur à un facteur 2).

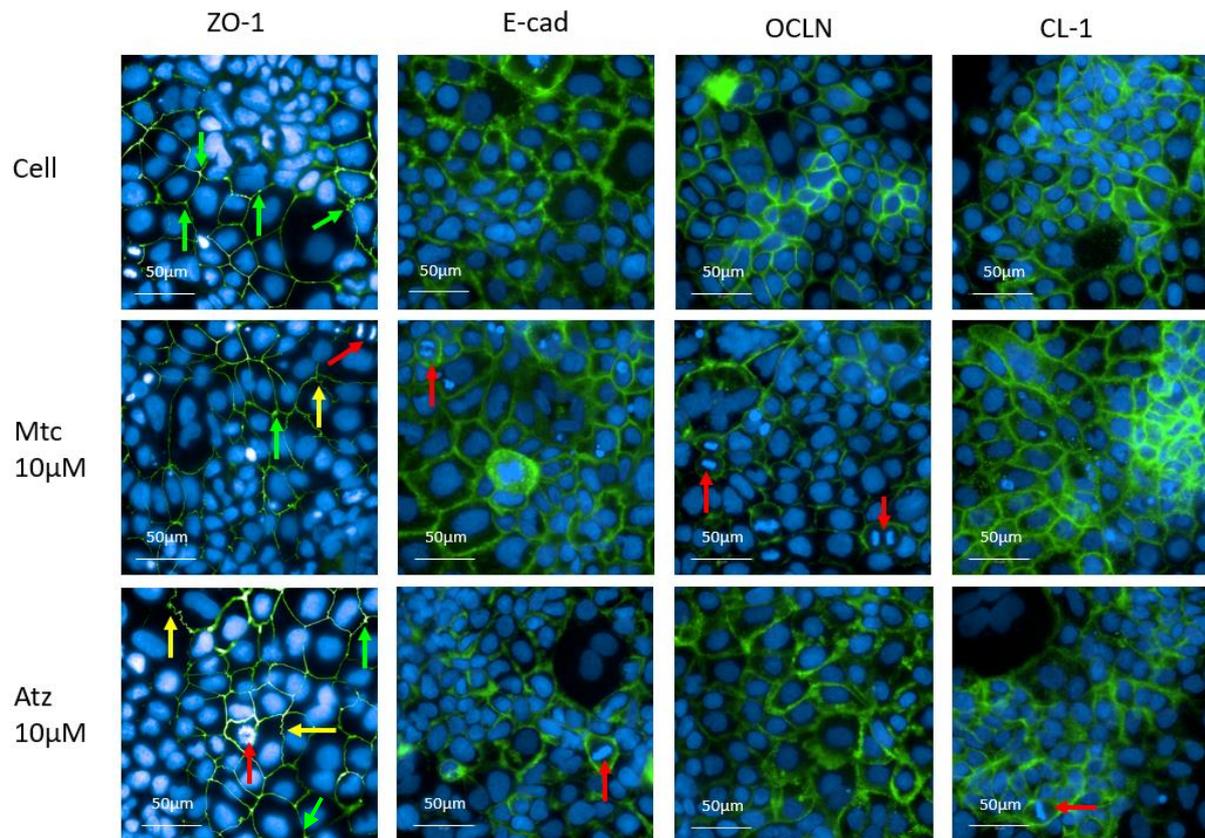
Les faibles effets sur la régulation des gènes des protéines de jonction ne sont pas suffisants pour affecter la production des protéines et leur fonctionnement sur la barrière intestinale d'après les résultats de Western-blot. Si l'on compare particulièrement les résultats de Western-blot et RT-qPCR de l'OCLN pour les cellules exposées au DEA à 10  $\mu$ M, nous retrouvons des effets opposés : une diminution de l'expression des gènes et une augmentation de l'expression protéique. Entre la transcription et l'étape de traduction, il existe un intervalle de temps qui peut être plus ou moins long selon les gènes, ce qui peut expliquer la différence entre nos résultats (Moore et al. 2018).

### 2.3.3. Morphologie et distribution des protéines de jonctions

Nous avons ensuite regardé l'expression des protéines de jonction par immunofluorescence. Des cellules ont été exposées en condition aiguë durant 24 h avec 10  $\mu$ M d'Atz ou de Mtc. CL-1, OCLN et E-cad sont des protéines transmembranaires qui possèdent une partie extracellulaire et une partie intracytoplasmique. ZO-1 est une protéine intracytoplasmique qui se lie aux protéines transmembranaires. La perméabilisation de la membrane cytoplasmique permet aux anticorps de se fixer sur les parties intracytoplasmiques des protéines de jonctions. L'émission de la fluorescence a été mesurée à l'aide de l'Operetta et les images montrées dans Figure 68 sont obtenues avec le logiciel Harmony.

Le premier critère regardé est l'aspect des noyaux colorés au DAPI. Ce marquage montre un nombre de mitoses plus important pour les cellules ayant été exposées au Mtc (flèches

rouges). Néanmoins, des investigations plus poussées au niveau du cycle cellulaire pourraient nous permettre de discriminer les effets du Mtc au niveau des phases de la division cellulaire.



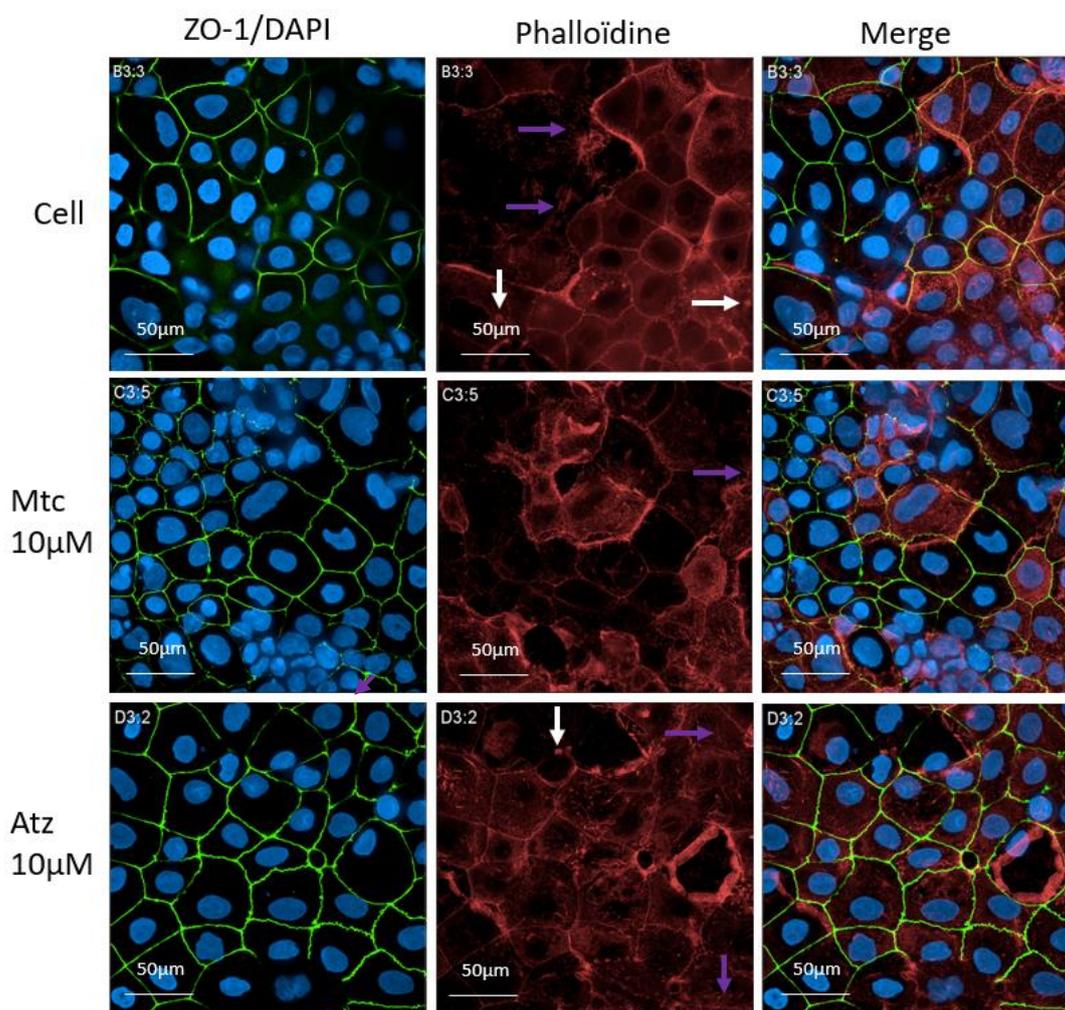
**Figure 68.** Immunomarkage des protéines de jonction cellulaire

Immunomarkage réalisé sur une culture Caco-2 de 7 jours exposée en condition aiguë durant 24 h aux Mtc et Atz 10 µM. Grossissement X63. Les noyaux sont marqués au DAPI et les protéines de jonction avec un Ac primaire anti ZO-1, anti-OCLN, anti-E-cad et anti-CL-1 puis un Ac secondaire couplé à l'Alexa 488.

Le second critère observé est la morphologie cellulaire. Il semble qu'en présence des herbicides, les bordures cellulaires forment des « zig-zag » visibles avec le marquage de ZO-1 (flèches jaunes) mais leur répartition dans les puits et selon les conditions reste variable. C'est pourquoi, il est difficile d'attribuer un effet des herbicides au niveau de la morphologie cellulaire. L'aspect diffus des bordures représentées par les protéines E-cad, OCLN et CL-1 ne permet pas d'évaluer ce paramètre morphologique.

Le troisième critère observé est la localisation des protéines de jonctions. ZO-1 est visible au niveau de la membrane cellulaire de façon très définie. Sur de nombreux champs, il a été remarqué des différences d'intensités. En condition normale (Cell), nous observons de nombreux points lumineux (Flèches vertes) au niveau des intersections entre 3 ou 4 cellules

et sur la membrane entre 2 cellules. L'exposition au Mtc et Atz 10  $\mu\text{M}$  montre moins de points lumineux. En complément d'information, nous avons réalisé une analyse de l'intensité de fluorescence au niveau des membranes cytoplasmiques à l'aide du logiciel Harmony de l'Operetta. Aucune différence statistique significative n'est ressortie sur l'intensité moyenne globale pour ZO-1. La localisation des autres protéines de jonction, soumises aux herbicides, ne semble pas différer de la condition normale. Néanmoins, nous avons remarqué l'apparition d'une texture « granuleuse » plus prononcée en intracytoplasmique pour la CL-1 avec le Mtc et l'OCLN avec l'Atz. La probable modification de texture peut être liée à une réorganisation du cytosquelette de la cellule pour s'adapter et maintenir la connexion entre les cellules.



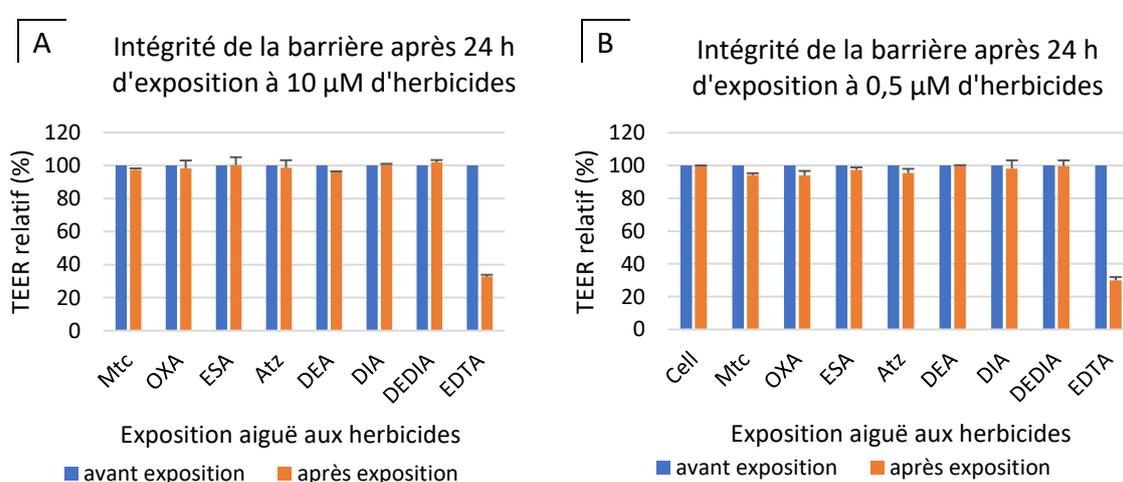
**Figure 69.** Immunomarkage du cytosquelette d'actine et de ZO-1

Marquage des noyaux (DAPI), de ZO-1 (Ac-Alexa488) et de l'actine (Phalloïdine) sur des cultures de Caco-2 de 14 jours traitées ou non avec 10  $\mu\text{M}$  de Mtc ou Atz en aiguë (durée de 24 h). Les images ont été acquises en confocale à l'objectif X63 de l'Operetta. Les images sont créées avec un maximum projection de 8 stack.

Nous avons donc regardé le lien entre ZO-1 et le cytosquelette avec un marquage des filaments d'actine à la phalloïdine. En fonction de la hauteur du stack nous apercevons une structure du cytosquelette différente (Figure 69). Au niveau basal, des points focaux sont visibles (Flèches blanches) alors qu'au niveau apical, ce sont des stries correspondant aux fibres d'actines (Flèches violettes). Nous remarquons que ces fibres se superposent à l'actine en bordure de membrane cytoplasmique. Cela n'est pas étonnant puisque ZO-1 est connue pour se lier au cytosquelette. Cependant, nous n'avons pas de différence majeure visible en microscopie confocale entre les cellules traitées et non traitées. Des analyses plus poussées sont nécessaires pour évaluer les modifications du cytosquelette.

#### 2.3.4. Etude de la perméabilité cellulaire intestinale

Le modèle de perméabilité cellulaire que nous avons retenu est l'utilisation d'une monoculture de Caco-2 sur des inserts Transwell. Ces cellules forment au cours du temps une barrière semi-perméable polarisée permettant d'étudier les voies de passages des molécules entre les cellules (paracellulaire) et au travers des cellules (transcellulaire). Pour évaluer les potentiels effets des herbicides sur ces voies de passage, nous avons en premier lieu vérifié, par mesure du TEER, que la barrière n'était pas endommagée en présence des herbicides.

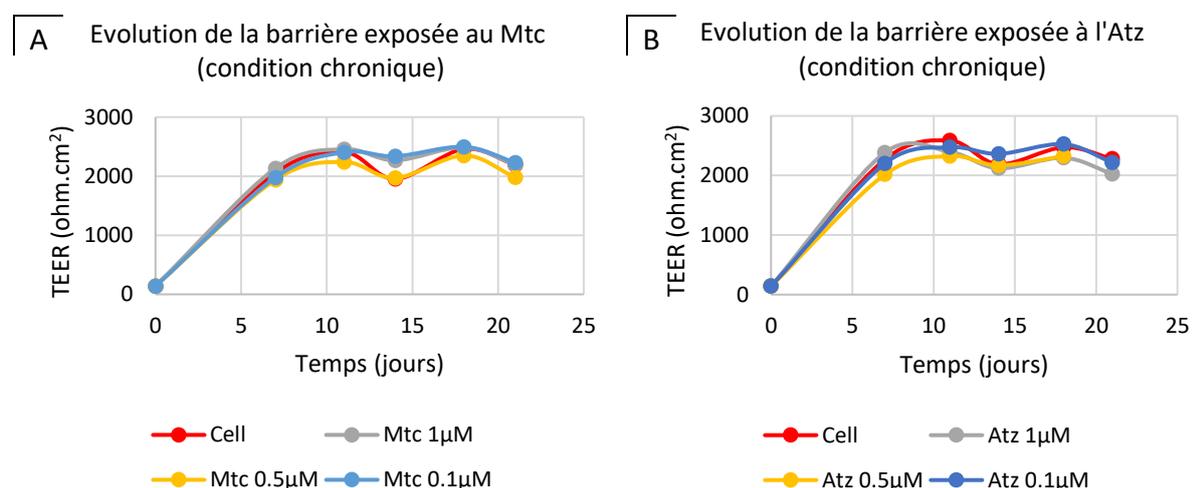


**Figure 70.** Intégrité de la barrière intestinale après une exposition aiguë à faible et forte concentration en herbicides

Mesure des valeurs du TEER de la barrière intestinale Caco-2 constituée sur 21 jours en présence ou non d'herbicides à **A**) forte concentration (10 µM) **B**) faible concentration (0,5 µM). Un contrôle positif est utilisé en ajoutant de l'EDTA 5 mM en apical. Les résultats sont exprimés en moyenne et ET de 2 réplicats biologiques.

A l'issue d'une exposition aiguë de 24 h à forte concentration (10  $\mu\text{M}$ ), aucune altération de la barrière n'a été observée (Figure 70A). Il n'y a pas non plus d'effet avec une faible concentration (0,5  $\mu\text{M}$ ) en herbicides (Figure 70B). Néanmoins, le contrôle positif nous indique qu'en présence d'EDTA 5 mM, la barrière est altérée et par conséquent le TEER diminue de 75 % (TEER < 800  $\text{ohm.cm}^2$ ).

Dans la nature, l'exposition aux herbicides est très souvent chronique. Le renouvellement cellulaire s'opérant continuellement dans notre intestin nous pousse à nous demander si les herbicides peuvent interférer dans le processus de formation de la barrière. Une expérience réalisée, cette fois en exposition chronique avec de faibles concentrations en Mtc et Atz, nous indique que les herbicides ne jouent aucun rôle lors de la constitution de la barrière. En effet, nous n'avons pas de différence entre les conditions traitées et non traitées (Figure 71).



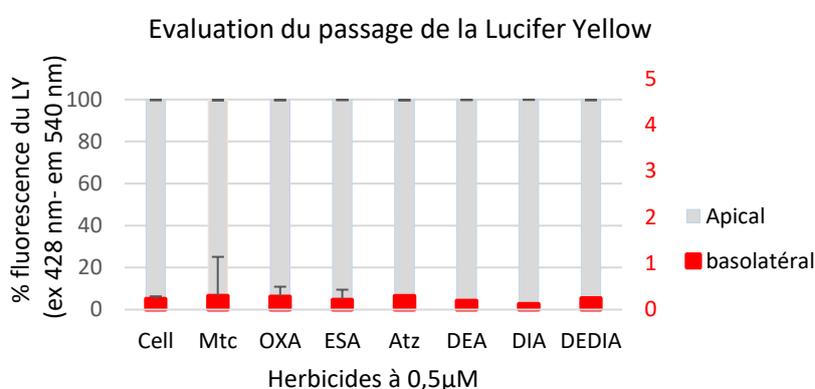
**Figure 71.** Suivi de l'intégrité de la barrière au cours d'une exposition chronique de 21 jours à une gamme d'herbicides

Suivi des valeurs du TEER lors de la formation de la barrière en présence ou non d'une faible concentration (0,1-0,5-1  $\mu\text{M}$ ) en **A**) Mtc **B**) Atz. Les résultats sont exprimés en moyenne et ET de 2 réplicats biologiques.

Le transport transcellulaire correspond au passage à travers la membrane plasmique des cellules épithéliales (diffusion simple, aquaporine, transporteur) et concerne les petites molécules. Le transport paracellulaire correspond au passage entre les cellules et fait intervenir les jonctions cellulaires. Le transport des molécules par cette voie est dépendant du poids moléculaire et de la flexibilité des molécules. Pour évaluer cette voie, nous avons choisi

deux molécules de poids moléculaires identiques, mais aux propriétés de transport paracellulaire différentes : la Lucifer Yellow et le FITC-Acide Sulfonique.

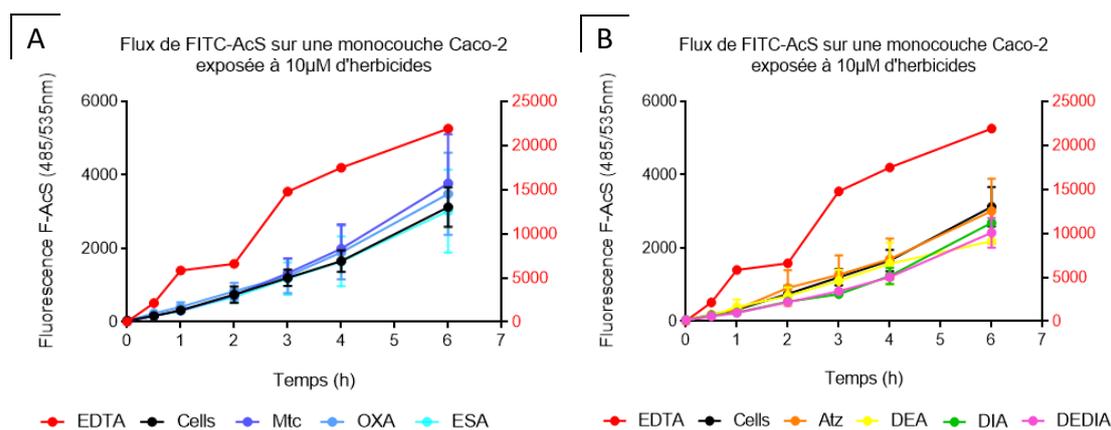
La Lucifer Yellow (LY) est une molécule connue pour ne pas traverser la barrière intestinale ni par passage transcellulaire, ni par passage paracellulaire. La LY (444 Da) est donc un bon marqueur d'intégrité membranaire. Après une exposition de 24 h aux herbicides, la LY est ajoutée en apical, puis la fluorescence émise par la LY est mesurée dans le compartiment apical et basolatéral après 4 h d'incubation. Les résultats nous indiquent que  $0,24 \pm 0,05$  % de la molécule a réussi à traverser, donc l'intégrité de la barrière n'a pas été affectée par les herbicides à  $0,5 \mu\text{M}$  (Figure 72).



**Figure 72.** Test de l'intégrité de la barrière épithéliale avec un marqueur paracellulaire

Mesure de la fluorescence émise par la Lucifer Yellow après 4 h d'incubation sur une monocouche de Caco-2 ayant été exposée à  $0,5 \mu\text{M}$  d'herbicides. Les résultats sont exprimés en moyenne et ET de 2 réplicats biologiques.

L'acide sulfonique couplé au FITC (F-AcS) est une molécule connue pour emprunter le transport paracellulaire et donc traverser la barrière. Des monocouches de Caco-2 ont été cultivées sur des inserts Transwell et exposées 24 h aux herbicides avant d'ajouter en apical le F-AcS. La fluorescence émise par le FITC est mesurée en cinétique dans le compartiment basolatéral. Une exposition aiguë de 24 h à  $10 \mu\text{M}$  nous indique qu'il y a peu de différence entre les cellules non exposées et celles ayant reçu le traitement au Mtc, OXA et ESA (Figure 73A). En effet, le contrôle EDTA montre qu'en présence d'une barrière altérée, le flux paracellulaire de F-AcS augmente considérablement. Les résultats concernant l'Atz et ses métabolites montrent un flux très proche de celui des cellules non traitées, mais avec une légère diminution du flux entre 2 h et 6 h pour les métabolites DIA et DEDIA (Figure 73B).

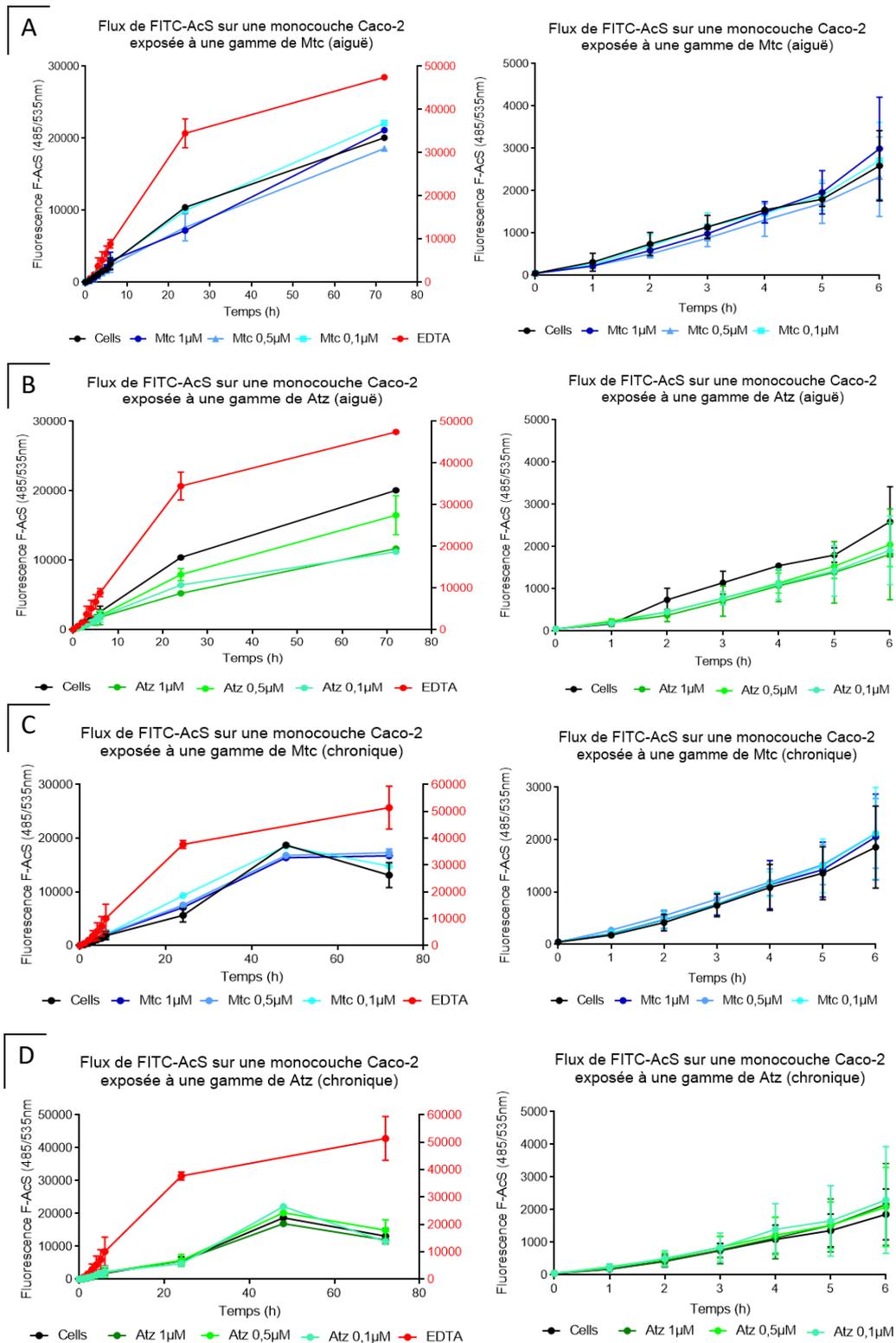


**Figure 73.** Evaluation de l'effet des herbicides à 10 µM sur la voie paracellulaire

Mesure de la fluorescence émise par le F-AcS au cours du temps. Le composé est ajouté en apical après une exposition aiguë durant 24 h à 10 µM de **A**) Mtc et ses métabolites **B**) Atz et ses métabolites. Une condition témoin avec de l'EDTA 5 mM (échelle Y droite) montre le flux avec une barrière altérée. Les résultats sont exprimés en moyenne et ET de 4 réplicats biologiques.

Une exposition aiguë durant 24 h à 0,1-0,5 et 1 µM au Mtc ne montre pas de différence de flux entre les cellules traitées et non traitées sur une cinétique allant de 0 à 72 h (Figure 74A). La cinétique entre 0 et 6 h souligne bien le fait que le Mtc n'induit pas de dommage au niveau de la voie paracellulaire. La diminution du flux de F-AcS observée avec une exposition aiguë à forte concentration est également retrouvée avec des faibles concentrations en Atz (Figure 74B). La différence avec les cellules non traitées est plus importante après 6 h d'incubation.

Une exposition chronique à 0,1-0,5 et 1 µM au Mtc n'induit pas de différence dans le passage de F-AcS (Figure 74C). A l'inverse de l'exposition aiguë, l'aztrazine ne semble plus diminuer le flux en condition chronique (Figure 74D). Nous supposons que les cellules en contact des herbicides Atz et de ses métabolites sur 21 jours mettent en place des mécanismes permettant un retour à l'homéostasie (l'équilibre des acteurs impliqués dans le passage paracellulaire).

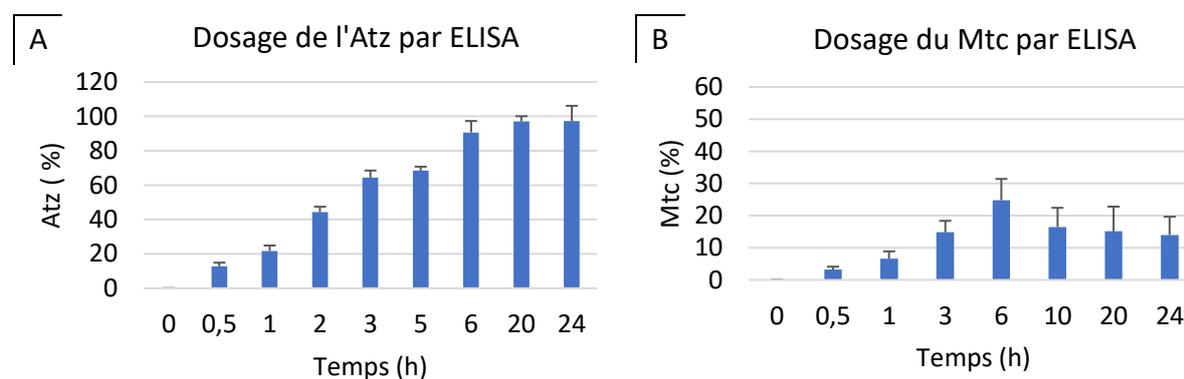


**Figure 74.** Evaluation de l'effet aiguë et chronique du Mtc et de l'Atz à faible concentration sur la voie paracellulaire

Mesure de la fluorescence émise par le F-AcS au cours du temps (0-6 h ou 0-72 h). Le composé est ajouté en apical après une exposition à trois concentrations (1-0,5 et 0,1  $\mu\text{M}$ ) d'herbicides en condition aiguë (24 h) **A**) et **B**) ou chronique **C**) et **D**). Une condition témoin avec de l'EDTA 5 mM (échelle Y droite) montre le flux avec une barrière altérée. Les résultats sont exprimés en moyenne et ET de 6 réplicats biologiques.

Un dosage des molécules mères Atz et Mtc a pu être effectué à l'aide de kits ELISA spécifiques. 1  $\mu\text{M}$  d'herbicides sont déposés en apical des Transwell et des prélèvements en basolatéral sont effectués régulièrement. D'après nos résultats, l'Atz traverse rapidement la barrière puisque dès 30 min d'incubation nous retrouvons 12 % de la quantité totale déposée dans le compartiment basolatéral. Dès 2 h d'incubation, la moitié des molécules ont traversé la barrière (Figure 75A). Au cours du temps, l'Atz continue de traverser la barrière jusqu'à 24 h. La vitesse du flux est très importante entre 0 et 6 h puis ralentie jusqu'à 20 h.

Dans le cas du Mtc, le passage de la barrière intestinale est moins important. En effet, dans le compartiment basolatéral nous avons un passage qui représente 3 % de la quantité totale déposée à 30 min (Figure 75B). Le passage de la molécule se poursuit jusqu'à 6 h d'incubation avec 22 % de Mtc. Puis entre 6 h et 24 h, la quantité de Mtc détectée diminue. Finalement après 24 h d'incubation, nous n'avons plus que 14 % du Mtc en basolatéral. Nous supposons que le Mtc est capable d'emprunter les deux sens de transport : de l'apical vers le basolatéral et du basolatéral vers l'apical.



**Figure 75.** Passage du Mtc et de l'Atz au travers de la barrière intestinale

Dosage par ELISA des prélèvements cinétiques effectués en basolatéral des Transwells de 30 min à 24 h suite à une exposition de la monocouche de Caco-2 à 1  $\mu\text{M}$  **A)** d'Atz et **B)** de Mtc. Les résultats sont exprimés en moyenne et ET de 4 réplicats biologiques.

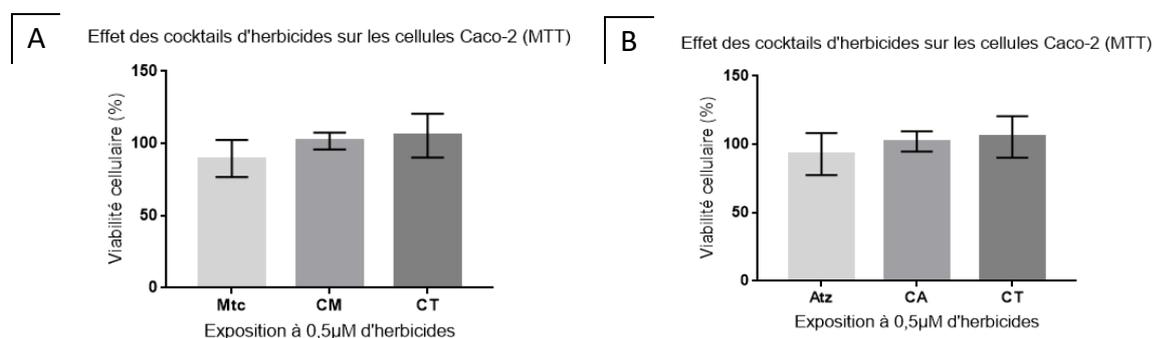
#### 2.4. Etude des effets cocktails des herbicides

L'utilisation des herbicides conduit à des accumulations de plusieurs molécules dans l'environnement. Il a été démontré que l'action de différences molécules regroupées en cocktail pouvait présenter des effets supérieurs aux molécules étudiées individuellement. Nous avons poursuivi nos recherches en réalisant trois cocktails : un cocktail CM

regroupant le métolachlore et ses deux métabolites (OXA et ESA) ; un cocktail CA regroupant l'Atz et ses trois métabolites (DEA, DIA, DEDIA) ; et un cocktail CT qui mélange toutes les molécules et leurs métabolites.

#### 2.4.1. Effets des cocktails sur les cellules Caco-2

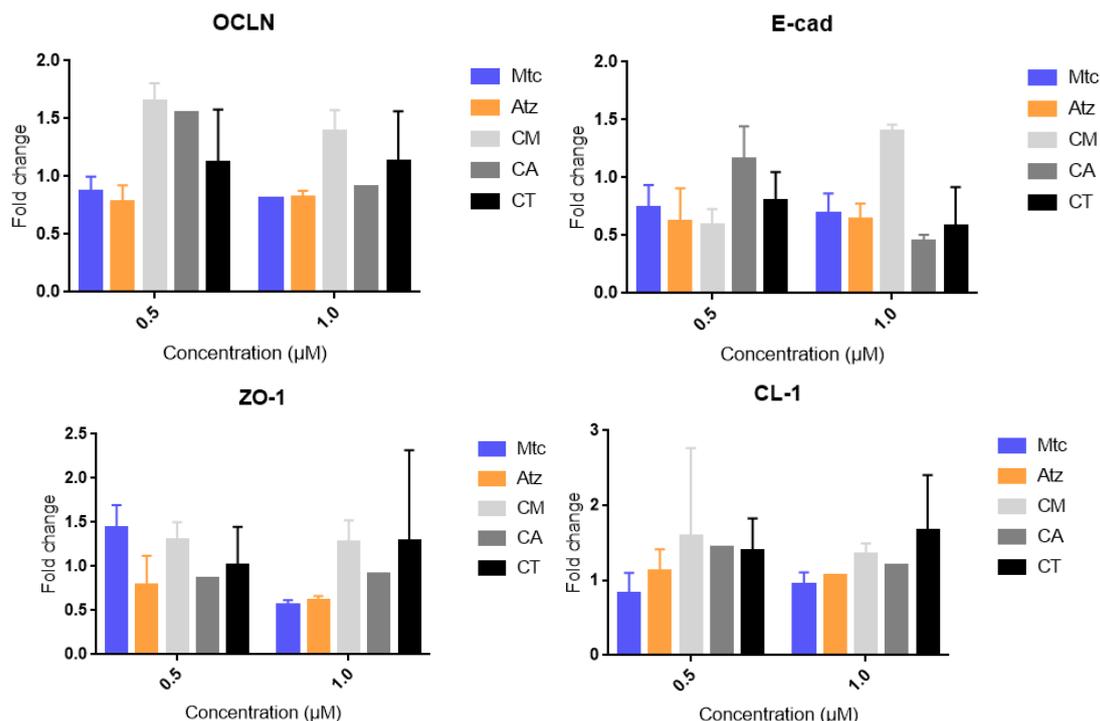
Les cocktails ne présentent pas d'effet cytotoxique sur les cellules Caco-2. Nous avons remarqué que le cocktail CT avait un pourcentage de viabilité cellulaire supérieur à 100 % (Figure 76). Il est possible que des mécanismes soient déployés par la cellule pour limiter la sensibilité aux cocktails d'herbicides.



**Figure 76.** Viabilité cellulaire des cellules Caco-2 exposées à des cocktails de 0,5 µM d'herbicides

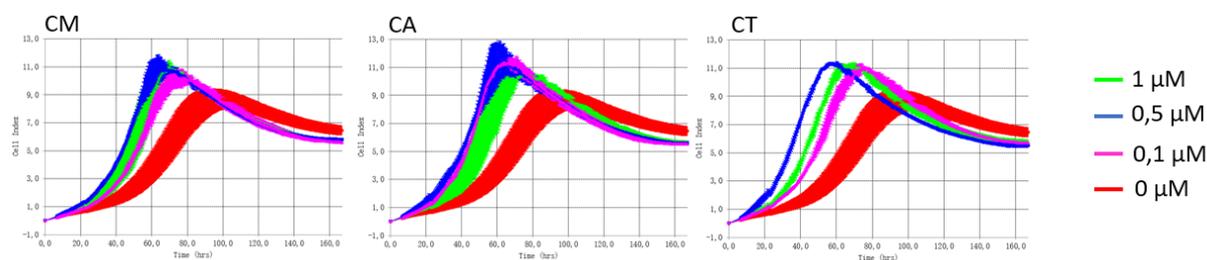
Des cellules Caco-2 sont exposées 24 h à 0,5 µM d'herbicides seuls ou en cocktail : **A)** Mtc, CM et CT **B)** Atz, CA et CT. Les graphiques sont représentés en pourcentage de viabilité par rapport aux cellules sans traitement et à la valeur de DMSO entraînant 100 % de toxicité cellulaire. Les résultats sont exprimés en moyenne et ET de 3 réplicats biologiques.

Les résultats de RT-qPCR effectués sur les gènes codant pour les protéines de jonction montrent des différences d'expression entre les molécules mères et les cocktails (Figure 77). Par exemple, nous avons une augmentation de l'expression de OCLN à 0,5 µM de CM, CA et CT. Nous avons également une augmentation de l'expression de OCLN avec 1 µM de CM et CT. Les effets sont moins importants sur le gène codant pour E-cad ; seul le cocktail CM à 1 µM entraîne une augmentation de son expression. Des tendances à la sous-expression de l'E-cad sont observées avec CM 0,5 µM et CA 1 µM. Des effets de surexpression sont visibles sur les gènes de ZO-1 à 1 µM avec les 3 cocktails bien que les écarts-types soient importants pour CT 1µM. Enfin, il est difficile de déterminer les effets des cocktails sur l'expression génique de CL-1 au vu des écarts-types importants.



**Figure 77.** Effet des cocktails sur l'expression des gènes codant pour les protéines de jonction RT-qPCR réalisée avec des extraits d'ARN d'une culture de Caco-2 exposée durant 14 jours aux herbicides seuls ou en cocktails à 0,5 et 1 μM. Les résultats sont exprimés en Fold Change par rapport aux cellules non traitées et normalisés par rapport à l'actine. Les graphiques représentent la moyenne et ET de 2 réplicats biologiques.

Dans la littérature, en raison des limites des variations de la technique, il est souvent considéré qu'un Fold change est significatif lorsqu'il y a un changement d'au moins deux fois, c'est à dire de plus de 2 ou moins de 0,5. D'après nos résultats, nous pouvons donc penser que les herbicides étudiés n'ont pas ou ont peu d'effet sur les expressions des protéines de jonction concernées (ZO1, E-cad, OCLN et CL1). Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure qu'ils aient un effet sur d'autres protéines de la cellule.



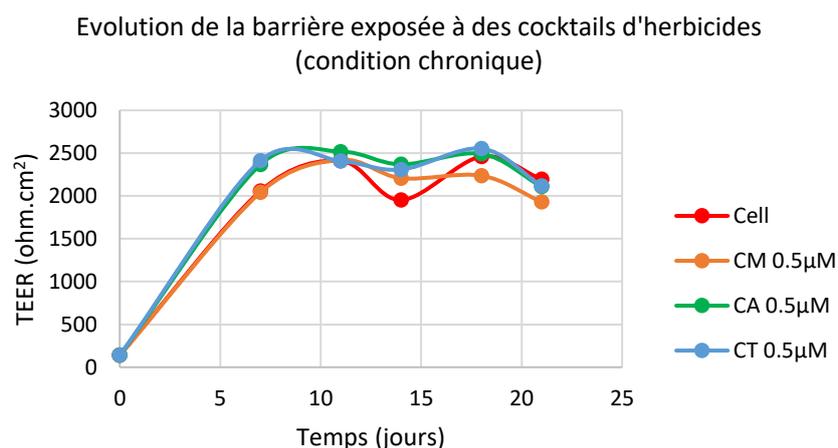
**Figure 78.** Effet des faibles concentrations en cocktails d'herbicides sur la prolifération cellulaire des Caco-2

Une gamme de 0-0,1-0,5 et 1 μM d'herbicides en cocktails sont déposés sur les cellules Caco-2. Les graphiques xCELLigence sont réalisés en moyenne et ET de 2 réplicats.

Les résultats de prolifération et d'adhésion cellulaire faites sur xCELLigence indiquent un décalage de la phase exponentielle par rapport aux cellules non traitées. Comme pour l'étude individuelle des herbicides, il existe des effets dose-dépendants avec les cocktails mais qui ne suivent pas une variation continue avec la dose. Les 3 concentrations 0,1-0,5 et 1  $\mu\text{M}$  sont très proches et donnent des  $\text{TE}_{50}$  ( $\sim 50$  h) similaires pour les cocktails CA et CM et un  $\text{TE}_{50}$  entre 35 et 40 h pour CT (Figure 78).

#### 2.4.2. Effets des cocktails sur la perméabilité membranaire

Nous avons aussi évalué l'effet des cocktails sur la barrière intestinale. La mesure du TEER avant et après une exposition aiguë (24 h) n'a pas montré d'altération de la barrière. Les valeurs de TEER relevées durant les 21 jours de constitution de la barrière épithéliale Caco-2 sous exposition chronique est une preuve supplémentaire montrant que les herbicides, même formulés en cocktail, n'endommagent pas la barrière (Figure 79).

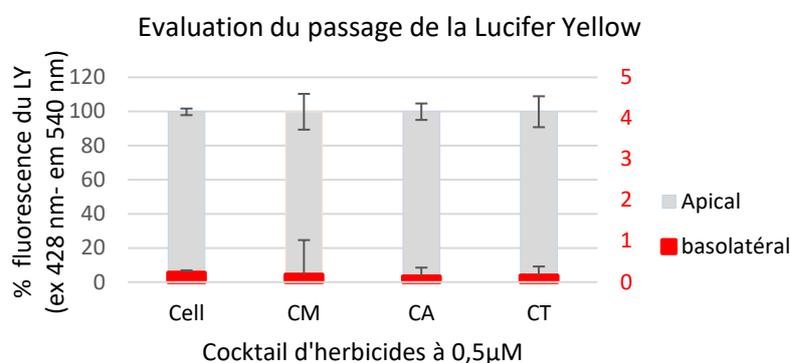


**Figure 79.** Intégrité de la barrière après une exposition chronique aux cocktails d'herbicides

Les monocouches différenciées de Caco-2 sont exposées en condition chronique avec des cocktails d'herbicides à 0,5  $\mu\text{M}$ . Mesure du TEER pendant les 21 jours de formation de la barrière. Les résultats sont exprimés en moyenne et ET de 2 réplicats biologiques.

Comme pour les herbicides et leur métabolites, l'intégrité de la barrière a été évaluée avec deux marqueurs de la voie paracellulaire la LY et le F-AcS. L'ajout des molécules s'est fait dans le compartiment apical après une exposition aiguë de 24 h aux cocktails sur une monocouche de Caco-2. Premièrement, les résultats démontrent que la barrière est intègre

car elle n'a pas laissé passer la LY. En effet, moins de 1 % de la LY est retrouvé dans le compartiment basolatéral (Figure 80).



**Figure 80.** Impact des cocktails d'herbicides sur le passage de LY par la voie paracellulaire

Mesure de la fluorescence émise par la Lucifer Yellow après 4 h d'incubation sur une monocouche de Caco-2 ayant été exposée à 0,5 μM d'herbicides. Les résultats sont exprimés en moyenne et ET de 2 réplicats biologiques.

Deuxièmement, le second marqueur de la voie paracellulaire indique le flux de F-AcS qui traverse la barrière au cours du temps. Les paramètres types d'exposition, concentration et formulation ont été étudiés. Le suivi du flux pour les cellules ayant été exposées au CM montre que le flux est diminué en condition aiguë alors qu'il y a moins de différence avec les cellules traitées en condition chronique (Figures 81B et 81C). Il est intéressant de comparer les flux entre les cocktails et les molécules mères car il y a des différences. Il est surprenant d'avoir une diminution du flux avec CM alors que nous avons vu que le Mtc, OXA et ESA n'avaient pas d'effets ou une légère augmentation du flux individuellement (Figure 81A).

Les deux autres cocktails CA et CT ont un flux diminué dans toutes les conditions. Les différences entre molécules seules et le cocktail sont moins marquées avec Atz et CA puisque l'Atz n'a soit pas d'effet soit elle entraîne une diminution du flux. Donc CA suit la même tendance que la molécule mère lorsque le flux est diminué. En regardant la cinétique des flux dans les temps courts (0-6 h) et les temps long (6 h-72 h) après une exposition aiguë de 24 h, nous confirmons que la diminution constatée est constante pour les cocktails à la fois à 10 μM et 0,5 μM.

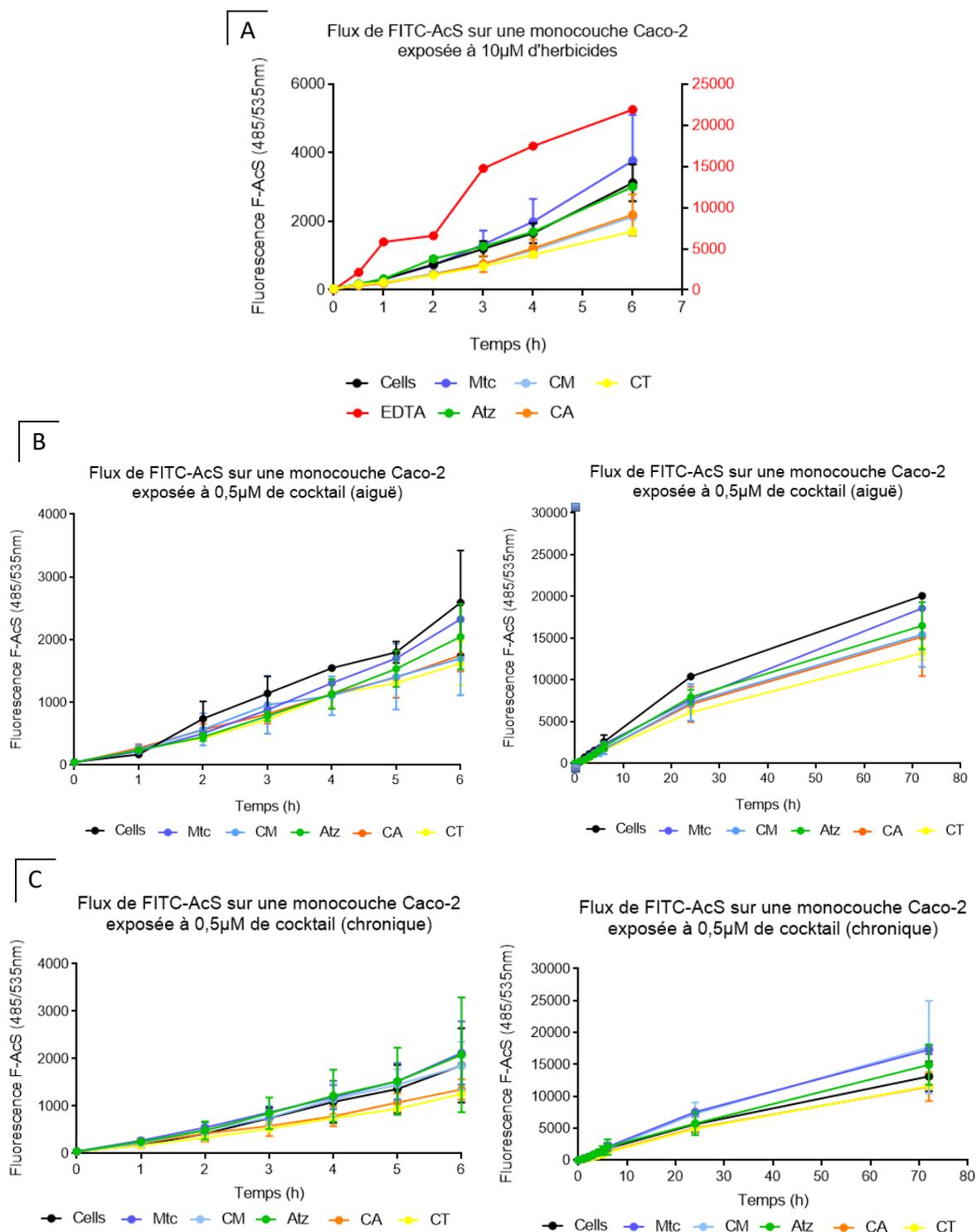


Figure 81. Impact des cocktails d'herbicides sur le passage de F-AcS par la voie paracellulaire

Mesure de la fluorescence émise par le F-AcS au cours du temps (0-6 h ou 0-72 h). Le composé est ajouté en apical après une exposition aiguë de 24 h à **A**) 10 µM **B**) 0,5 µM de cocktails d'herbicides ou en condition chronique **C**) 0,5 µM de cocktails. Une condition témoin avec de l'EDTA 5 mM (échelle Y droite) montre le flux avec une barrière altérée. Les résultats sont exprimés en moyenne et ET de 2 à 3 réplicats biologiques.

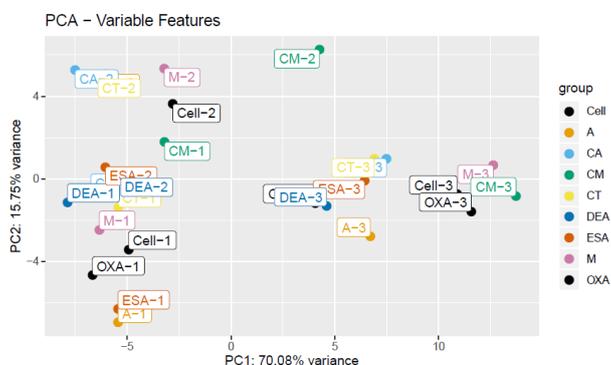
Un calcul des pentes a été réalisé pour comparer la vitesse des flux entre les conditions (Tableau 11). Le cocktail CT se distingue des deux autres par une pente plus faible. La valeur de la pente exprime le débit avec lequel traverse le F-AcS (une quantité en fonction du temps), c'est-à-dire que F-AcS en présence du cocktail CT traverse moins vite la barrière entre 0 et 6 h qu'il ne le fait lorsqu'il est en présence des cocktails CM et CA. Les coefficients de détermination linéaire ( $R^2$ ) ont également été indiqués pour montrer la qualité de prédiction des flux.

**Tableau 11.** Comparaison des flux de F-AcS en fonction des conditions de traitement des cellules Caco-2.

	Exposition aiguë				Chronique	
	10 $\mu$ M		0,5 $\mu$ M		0,5 $\mu$ M	
	pente	R <sup>2</sup>	pente	R <sup>2</sup>	pente	R <sup>2</sup>
Cell	503,7 $\pm$ 35,88	0,9426	417,3 $\pm$ 40,48	0,8985	234,6 $\pm$ 20,16	0,9186
CM	341,7 $\pm$ 20,74	0,9577	280,4 $\pm$ 39,15	0,8104	305,2 $\pm$ 29,61	0,8985
CA	355,3 $\pm$ 33,58	0,9032	284,7 $\pm$ 20,25	0,9428	214,6 $\pm$ 19,06	0,9135
CT	274,5 $\pm$ 15,56	0,9842	269,9 $\pm$ 19,98	0,9383	200,7 $\pm$ 8,006	0,9813

### 2.4.3. Effets des cocktails sur l'ensemble du génome

La méthode de séquençage des ARN du génome entier permet de regarder l'effet de molécules sur l'expression des ARNm. Trois séries d'échantillons cellulaires ont été réalisées. Les cellules ont été exposées à 0,5  $\mu$ M d'herbicides seuls ou en cocktails tout au long des 14 jours de culture. L'analyse en composantes principales détermine la variabilité entre les séries. La Figure 82, nous indique que les séries 1 et 2 sont proches tandis que la série 3 présente une variance élevée par rapport aux deux autres.

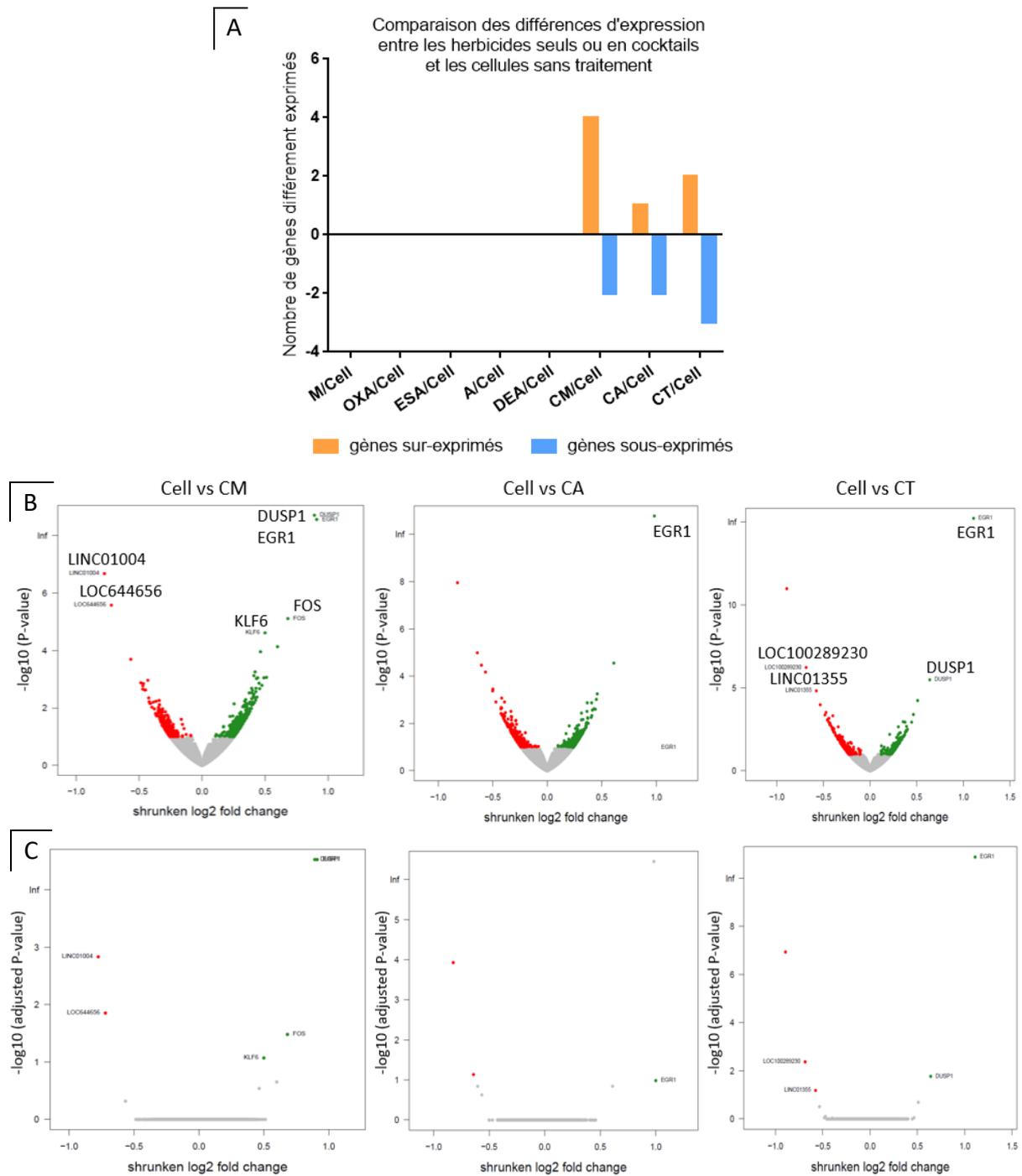


**Figure 82.** Analyse en composantes principales des séries biologiques

Lorsque l'on compare l'expression des gènes entre notre condition témoin (cellules sans traitement) et les herbicides, nous constatons que les molécules mères Mtc et Atz et leurs métabolites n'ont pas d'effet significatif en comparaison du groupe contrôle. Par contre, il apparaît que les herbicides formulés en cocktails impliquent une régulation différente des gènes. La Figure 83A indique le nombre de gènes sur et sous exprimé (avec la p-value ajustée), pour les cellules ayant reçu des cocktails en exposition chronique, par rapport aux cellules sans traitement.

En effet, les trois cocktails CM, CA et CT ont de plus fortes différences d'expression des gènes. Les volcano-plot traduisent la différence d'expression des gènes entre la condition cocktail et la condition témoin (Figure 83B). En appliquant une p-value plus stricte, nous avons découvert que deux gènes sont fortement sur-exprimés dans chaque condition cocktail (*EGR1* et *DUSP1*) (Figure 83C). La protéine codée par le gène *DUSP1* (dual specificity phosphatase 1) est une phosphatase à double spécificité pour la tyrosine et la thréonine. La protéine codée peut déphosphoryler la MAP kinase MAPK1/ERK2, ce qui entraîne son implication dans plusieurs processus cellulaires. La protéine codée par le gène *EGR1* (early growth response 1) appartient à la famille EGR des protéines à doigts de zinc. C'est une protéine nucléaire qui fonctionne comme un régulateur transcriptionnel.

D'autres gènes sont plus spécifiquement impactés selon le type de cocktail. Par exemple CM est responsable : d'une diminution de l'expression de *CLIC2*, un gène impliqué dans la formation des protéines de canal intracellulaire de chlorure ; d'une augmentation du gène *PLK2*, un membre de la famille polo des protéines kinases sérine/thréonine qui jouent un rôle dans la division cellulaire normale ; d'une augmentation de *MUC4*, une glycoprotéine composant le mucus qui recouvre les cellules épithéliales. Pour CA, nous pouvons relever une augmentation des gènes suivants : *MUC16* qui code pour une protéine de la famille des mucines et *ZACN* un gène impliqué dans la formation des canaux ioniques ligand-dépendants et activés par le zinc. Pour CT, nous remarquons la surexpression du pseudogène *INGX* de la famille des inhibiteurs de croissance et du gène *VIPR2* codant pour les récepteurs de peptides vasoactifs intestinaux (Figure 84). Les données de séquençage présentées ici sont des analyses primaires qu'il convient d'exploiter davantage. Des analyses différentielles plus poussées sont en cours avec notamment des analyses d'enrichissements qui utilisent des jeux de gènes regroupés par leur implication dans la même voie biologique.



**Figure 83.** Analyse différentielle des gènes par RNAseq

**A)** Graphique représentant le nombre de gènes différemment exprimés entre toutes les conditions testées. Le nombre de gènes a été déterminé en prenant la p-value ajustée. **B)** Volcano-plot représentant la quantité de gènes sous-exprimés (en rouge) et sur-exprimés (en vert) des cocktails CM, CA et CT par rapport aux cellules sans traitement. **C)** Volcano-plot avec une p-value ajustée révélant les gènes les plus impactés.

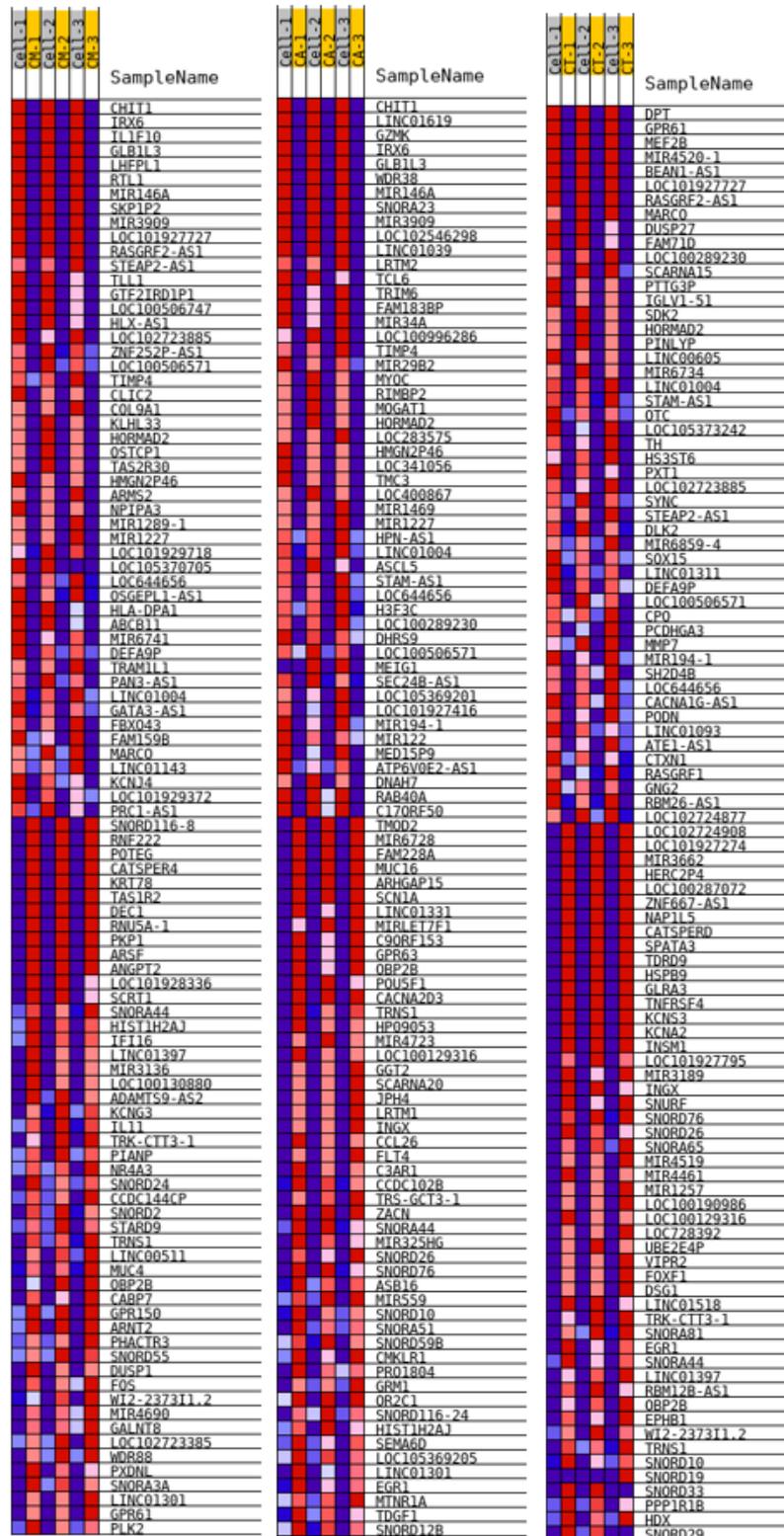


Figure 84. Heatmap des principaux gènes différentiellement exprimés entre les cellules non traitées et les cocktails

La carte thermique montre le nombre de marqueurs normalisés pour les 40 premiers gènes différentiels. Chaque ligne correspond à un gène et chaque colonne à un échantillon. L'échelle de couleur indique les similarités entre les cellules non traitées et les cocktails exprimant faiblement (dégradé de bleu) et fortement (dégradé de rouge) les gènes.

### 3. Discussion

Cette seconde partie de mon projet de thèse s'est intéressée aux effets de molécules chimiques aux propriétés phytosanitaires (herbicides) retrouvées dans l'eau de boisson destinée à la consommation humaine et qui, par conséquent circulent, dans le tractus gastro-intestinal. Cette étude a tout d'abord nécessité la mise en place d'un modèle cellulaire *in vitro* et l'utilisation de technologies nouvelles (Operetta, xCELLigence) pour évaluer de nombreux paramètres biologiques. Dans cette partie, nous allons discuter des différents paramètres étudiés et confronter nos résultats entre eux. Nous aborderons également les limites rencontrées au cours du projet.

Le modèle cellulaire *in vitro* que nous avons sélectionné pour étudier les interactions entre la barrière intestinale et les molécules à tester tente de concilier la polarisation cellulaire et l'expression des protéines de jonction (qui sont à l'origine de la perméabilité de la barrière intestinale). La différence de croissance cellulaire observée entre la lignée HT-29 et Caco-2 dans nos conditions expérimentales était d'environ 24h. Les cellules HT-29 se divisent plus rapidement que les cellules Caco-2 mais mettent plus de temps pour atteindre 100 % de confluence en raison du petit diamètre des cellules. Cette différence entre les deux lignées est également rapportée par Van Eyk (Van Eyk 2015). Le suivi de la résistance de l'épithélium intestinal en fonction du temps de culture des cellules nous a indiqué que les cellules HT-29 avaient un TEER très faible en comparaison de Caco-2. Nous confirmons les observations de Gagnon et al. qui ont montré une faible augmentation du TEER du jour 0 au jour 21 pour HT-29 (Gagnon et al. 2013). Les valeurs du TEER pour les modèles de coculture varient selon les souches utilisées, néanmoins les études s'accordent à dire que la valeur TEER est inférieure à une monocouche Caco-2 (Lv et al. 2019). La présence des HT-29 dans la coculture augmente le nombre d'espaces intercellulaires, par la modulation des jonctions cellulaires, et réduit la valeur du TEER (Rocha, Vélez, et Devesa 2012). Le choix du modèle pour la suite des expériences s'est porté sur la monoculture de Caco-2, modèle simple de la barrière intestinale fréquemment utilisé dans la littérature.

Nous avons travaillé avec des cellules Caco-2 entre le passage 51 et 60 pour l'ensemble des expériences provenant d'un même lot de cellules, afin d'éviter toutes dérives et d'avoir

une meilleure reproductibilité (Briske-Anderson, Finley, et Newman 1997). L'âge des cellules peut impacter le niveau de métabolisme et donc réduire les effets observables des herbicides. Grâce à des études de cytotoxicité, effectuées à la fois par la méthode de MTT et d'ATP, nous avons pu mettre en évidence que, dans nos conditions, les herbicides utilisés seuls ou en cocktails, ne semblent pas modifier la viabilité et le métabolisme des cellules Caco-2. Il semblerait que la toxicité serait moins importante à 50  $\mu\text{M}$  qu'à 10  $\mu\text{M}$ . Les seuils toxicologiques sont de différentes natures, certaines molécules ont une relation effet-dose tandis que d'autres ont une fenêtre d'action plus restreinte et donnent des courbes dites non monotones en « U » ou «  $\Omega$  ». Dans l'étude de Doherty, les Caco-2 ont présenté un profil de toxicité non monotone lors d'une exposition au cuivre (O'Doherty et al. 2019).

L'absence de protocoles normalisés pour déterminer les effets de polluants sur la santé humaine nous a conduits à utiliser une technologie nouvelle pour nos applications *in vitro*. La technologie xCELLigence mesure le flux d'électrons transmis entre des micro-électrodes positionnées dans les puits de la plaque de culture. Les cellules adhérentes vont perturber le flux et la résistance au courant (impédance) sera exprimée graphiquement par un indice cellulaire (IC). La magnitude de l'IC va dépendre du nombre de cellules, de leur morphologie, de leur taille et de la force d'attachement des cellules au substrat recouvrant la plaque (Hamidi, Lilja, et Ivaska 2017) . Avec le suivi de ces paramètres, il est possible d'évaluer les effets sur la prolifération cellulaire et la toxicité des molécules (Y. Chen et al. 2009 ; Çetin et Topçul 2019). Cet outil permet d'utiliser moins de cellules et de milieu de culture qu'une méthode conventionnelle dans des puits de culture. Une optimisation des conditions d'ensemencement nous a permis de déterminer que  $1,5 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> étaient la condition optimale pour ne pas avoir une croissance trop lente qui entraînerait une dérive des cellules ou une croissance trop rapide qui ne permettrait pas d'observer les effets des molécules. Chiu a montré dans son étude sur les ténocytes que lorsque  $4 \times 10^4$  ténocytes/cm<sup>2</sup> sont utilisés, la pente de prolifération n'était pas aussi inclinée que celle observée lors de l'ensemencement à  $2 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> (Chiu et al. 2017). Nos expérimentations xCELLigence montrent un léger décalage de la vitesse de prolifération des cellules Caco-2 en présence de la plupart des herbicides, en particulier aux plus faibles concentrations. Ces résultats semblent indiquer que ces molécules peuvent induire une légère modification de la morphologie et/ou de la force d'adhésion des cellules par un mécanisme encore indéterminé. En nous basant sur la

littérature, nous avons utilisé un milieu de culture enrichi en glucose (4,5 g/L) et avec 10 % de sérum. Le sérum de veau foetal est un complément qui facilite la prolifération, le métabolisme et la différenciation cellulaire. Il aurait été intéressant de nous placer dans des conditions moins favorables à la prolifération cellulaire. Effectivement, diminuer la quantité de glucose (1 g/L) et le pourcentage en sérum pourrait éventuellement augmenter les contrastes et pourrait peut-être mieux différencier les effets de la concentration en herbicides sur la prolifération cellulaire (Wosu, Parisella, et Kalant 1983).

L'expression des protéines de jonction est un paramètre essentiel à évaluer en pharmacologie, c'est pourquoi nous avons regardé l'effet des herbicides sur l'expression de ces protéines par Western-blot. Peu d'effet ont été observés à 0,5  $\mu$ M mais une tendance à la surexpression de l'OCLN par le DEA et un effet de sous-expression de la CL-1 par DEDIA ont pu être observés à 10  $\mu$ M. Les expressions des gènes codants pour les protéines de jonction ont également été étudiées par RT-qPCR. Nos résultats montrent principalement des différences d'expression entre les molécules mères et les cocktails. En attendant de comprendre la faible reproductibilité des résultats et leur différence avec les résultats de qPCR, ces résultats restent provisoires. L'exemple de l'OCLN est le plus parlant puisque nous remarquons une augmentation de l'expression protéique mais une diminution de l'expression génique. Entre l'étape de transcription et l'étape de traduction, il existe un intervalle de temps qui peut être plus ou moins long selon les gènes. Des cinétiques ont montré que la traduction commençait au moment où le niveau de transcription diminuait, ce qui peut expliquer la différence entre nos résultats (Moore et al. 2018). Des publications montrent également qu'il y a une augmentation de l'expression des protéines des canaux de transport intercellulaires lors de la différenciation par rapport aux Caco-2 non différenciées (Ahlin et al. 2009). Le terme de différenciation désigne ici la capacité des cellules Caco-2 (à 100 % de confluence) à former une barrière cohésive. Mises à part les études de perméabilité cellulaire réalisées sur des Transwell, l'ensemble des expériences ont été faites sur des monocouches de 14 jours non polarisées mais différenciées.

L'organisation et la localisation des protéines de jonction sont des indicateurs de la santé de la barrière. Les jonctions serrées sont connues pour avoir un rôle crucial dans l'établissement de la polarité cellulaire et la régulation de la perméabilité paracellulaire dans les épithéliums. Nous avons couplé la mesure du TEER à l'utilisation des marqueurs de la voie

paracellulaire pour évaluer indirectement l'effet des herbicides sur les protéines de jonction. La perméabilité cellulaire conférée en partie par les protéines de jonction a été réalisée à l'aide de la technologie Transwell. Aucune modification du TEER, à faible et forte concentration, n'a été constatée en présence des herbicides seuls ou en cocktails. De même, le marqueur paracellulaire LY n'a pas traversé les monocouches pour les herbicides seuls et en cocktail. Le deuxième marqueur de la voie paracellulaire nous a montré des résultats intéressants puisqu'une légère diminution du flux de F-AcS a été remarquée pour les métabolites DIA, DEDIA et les trois cocktails entre 2 h et 6 h d'exposition. Une diminution du flux paracellulaire peut être associée à une augmentation de l'expression des claudines. Lors de nos travaux, nous avons en effet observé que certains cocktails ont tendance à légèrement augmenter l'expression des ARNm de l'OCLN et de la CL-1 alors que les effets sont moins marqués avec un herbicide pris seul. Van Itallie rapporte que la diminution de la conductance paracellulaire résultait d'une diminution sélective de la perméabilité  $\text{Na}^+$ . Or les principaux transporteurs du  $\text{Na}^+$  sont des claudines. Il précise également dans son étude que la sur-expression de CL-4 diminue le passage paracellulaire mais ne modifie pas les jonctions serrées ZO-1 ou OCLN (C. Van Itallie, Rahner, et Anderson 2001). L'utilisation que nous avons faite de l'EDTA comme témoin positif dans nos expériences est représentative d'une altération de la barrière. En effet, tous les résultats que nous avons obtenus en présence d'EDTA montrent une diminution du TEER et une augmentation du flux F-AcS. Yu et al. décrivent que l'EDTA augmente l'ouverture des canaux paracellulaires sans détruire les protéines qui composent le canal (Q. Yu et al. 2013).

Au vu des différences de flux paracellulaires observées avec certains métabolites et les cocktails, nous avons souhaité déterminer la capacité d'absorption de l'Atz et du Mtc par les cellules Caco-2. Nous avons constaté que les kits ELISA employés pour réaliser les dosages avaient des sensibilités différentes aux herbicides. Le kit de l'Atz est bien plus reproductible et sensible puisqu'il nécessite deux fois moins d'échantillon et possède un signal de détection plus intense. Notre étude a montré que l'Atz et le Mtc traversaient la monocouche différenciée et polarisée Caco-2. Néanmoins, nous nous interrogeons sur les résultats du Mtc après 6 h d'incubation puisque le passage n'est pas total. Il serait intéressant de comprendre par quel mécanisme le Mtc traverse pour déterminer si une accumulation intracytoplasmique est possible. Le sens de circulation (apical vers basolatéral et basolatéral vers apical) est une

question qui demeure puisque nous avons une diminution de la quantité de Mtc en basolatéral entre 6 h et 10 h.

Le passage des herbicides associé à la modification du flux paracellulaire nous a poussés à évaluer la morphologie cellulaire et la localisation des protéines de jonction par immunofluorescence. Nous avons eu l'opportunité de travailler avec un appareil de microscopie confocale automatisé nommé Operetta CLS. Nos images de microscopies, révèlent une fluorescence dispersée et inégale autour de la membrane pour OCLN, CL-1 et E-cad, ce qui donne aux jonctions un aspect perlé (Q. Yu et al. 2013). Ces trois protéines se retrouvent également dans le cytoplasme des cellules alors qu'elles sont transmembranaires. Dans le cas de ZO-1 qui est intracytoplasmique, la protéine peut aussi se retrouver dans le noyau en plus d'être associée à la membrane plasmique (Gottardi et al. 1996). La présence des protéines OCLN, CL-1 et E-cad en intracytoplasmique a été décrite après incubation des cellules Caco-2 avec le SDS, l'EDTA ou encore le sodium cholate (Q. Yu et al. 2013). Il a même été révélé que la localisation subcellulaire de la CL-1 dans le cytoplasme est associée à la progression tumorale dans le cancer du côlon (Cherradi et al. 2017). Cependant, dans notre cas, nous retrouvons cet aspect dans notre condition témoin correspondant aux cellules sans traitement. Une deuxième limite expérimentale est l'absence de témoin positif. Le DMSO que nous avons utilisé endommage la structure cellulaire, ce qui ne permet pas d'évaluer l'organisation des jonctions intercellulaires. Aussi, il est difficile d'identifier des différences de localisation dans notre étude. De plus, l'immunomarquage en plaque ne permet pas d'apprécier la distribution sur toute la hauteur de la barrière. Saeedi et al. indiquent que la hauteur des cellules Caco-2 a été modifiée à la suite d'un changement de structure des jonctions serrées (Saeedi et al. 2015). Il serait préférable de marquer directement les monocouches constituées en Transwell puis de réaliser des inclusions en paraffine pour faciliter les coupes transversales. Par cette technique, il a été possible d'identifier l'association de la CL-1 à la fois avec les jonctions serrées en bordure latérale mais également en position apicale (Nunbhakdi-Craig et al. 2002).

Dans des conditions normales, sans traitement, les filaments d'actine sont sous forme de stries et facilitent l'ancrage des complexes OCLN-ZO-1. La coloration de l'actine à la phalloïdine est visible sous forme d'une couche parallèle à la surface apicale. La coloration est plus intense au niveau des jonctions serrées et s'étend vers le noyau ensuite de façon plus diffuse. Cette

organisation qui laisse des zones intracytoplasmiques sans coloration a aussi était retrouvée par Moyes et al. (Moyes, Morris, et Carr 2010). Ils expliquent que des fibres d'actine sont perpendiculaires à la surface apicale, ce qui peut expliquer les points que l'on a sur nos images. La forme des noyaux irrégulière, en présence des polluants, a été documentée. Les cellules Caco-2 sont grandes et pléomorphes, c'est-à-dire qu'elles sont capables de changer de forme sous certaines influences. Cela entraîne des jonctions irrégulières, en dents de scie ou « zig-zag ». Avec une autre lignée épithéliale T84, les ondulations de la membrane, visibles avec un marquage de ZO-1, ont été retrouvées à la suite d'un stress (Saeedi et al. 2015). Moyes a pu compter qu'une cellule pléomorphe peut avoir 9 à 29 cellules environnantes. Ces cellules peuvent également ne pas présenter de noyaux. Comme pour nous, dans la majorité des cas, il n'est pas possible de distinguer une couche d'actine apicale ou latérale de celle trouvée en périnucléaire car la coloration de l'actine était présente dans tout le cytoplasme. La méthode d'analyse utilisée avec le logiciel Harmony de l'Operetta ne nous a pas permis de statuer sur les effets des herbicides sur les jonctions protéiques. Il est possible que la détection des changements au niveau des jonctions serrées ne soit pas possible alors que des particules dans les espaces intercellulaires sont visibles (Madara et Pappenheimer 1987). Enfin, les protéines associées aux jonctions serrées comme Pals ou Marvel mériteraient également d'être étudiées car elles sont liées au cytosquelette de la cellule.

Notre projet s'est intéressé à quatre protéines de jonction mais il en existe de nombreuses autres qui peuvent être impactées par les herbicides. Notre étude possède aussi des limites techniques qui ne permettent pas toujours d'apporter une réponse satisfaisante à nos problématiques. Premièrement, bien que ce modèle *in vitro* soit adapté et reconnu par les autorités européenne (EMA) et américaine (FDA) pour les études de perméabilité, il n'est pas la véritable représentation des conditions *in vivo*. Par exemple, les cellules Caco-2 ont des valeurs de TEER beaucoup plus élevées qu'un segment d'intestin (Artursson, Ungell, et Löfroth 1993). De plus, la lignée Caco-2 ne possède pas de p53 fonctionnelle en raison d'un codon stop, ce qui pourrait limiter la sensibilité aux herbicides via une baisse de la capacité apoptotique des cellules (Djelloul et al. 1997). Enfin, il a été montré que les lignées cancéreuses sur-expriment un certain nombre de protéines d'efflux les rendant multi résistantes aux xénobiotiques (Sharom et al. 1999). Comparée à d'autres types cellulaires, la lignée Caco-2 apparaît moins sensible aux xénobiotiques (Naruhashi et al. 2011). Il pourrait

être intéressant de reproduire cette étude avec une autre lignée épithéliale comme T84 par exemple.

Enfin, nous avons mené des études transcriptomiques. Ces travaux montrent une modulation de divers gènes suite à une exposition aux cocktails CM, CA et CT, ce qui indique un effet possible synergique des herbicides (Rainey et al. 2017). De plus, l'absence de différence significative entre les herbicides et les métabolites vis-à-vis des cellules non traitées vont dans le même sens que nos précédentes observations. Nous envisageons toutefois de réaliser une correction de l'effet batch au vu de la variabilité qui est présente entre nos trois séries d'échantillons. Parmi les gènes fortement sur-exprimés, nous retrouvons des gènes impliqués dans la voie de communication cellulaire (*CLIC2*, *ZACN*) et la voie de signalisation des kinases (*EGR1*, *DUSP1*, *MUC4*, *MUC16*).

*EGR1* favorise la prolifération, la différenciation et la transformation des cellules mais il peut également jouer un rôle dans l'apoptose (Vivacqua et al. 2012). Il est possible que les cocktails puissent entraîner un stress pour les cellules conduisant à la régulation à la hausse du gène *EGR1*. Ce n'est pas la première fois que des xénobiotiques ont induit cette surexpression. Une étude sur les particules des cigarettes montre l'activation de la NADH oxydase entraînant la production de ROS qui a conduit à l'activation des MAP Kinases et la régulation à la hausse d'*EGR1* (Mo et al. 2012). Revest et al. expriment clairement que les voies MAPK et *EGR1* sont liées au stress cellulaire (Revest et al. 2005). Moon et al. expliquent que la régulation à la hausse du gène *EGR1* via les signaux ERK1/2 atténue la cytotoxicité médiée par le sulfure de sulindac dans les cellules épithéliales intestinales humaines (Moon, Yang, et Kim 2007). Ce gène peut être une preuve de plus dans notre tentative d'expliquer la non sensibilité des Caco-2 pour l'Atz et le Mtc. Un autre gène impliqué dans la voie des MAPK est *DUSP1*. Ce dernier est impliqué dans plusieurs processus cellulaires dont l'inhibition des MAPK activées par des agents mitogènes. De plus, p53 est un régulateur transcriptionnel de *DUSP1* dans les réponses au stress (Y.-X. Liu et al. 2008).

*CLIC2* est un gène impliqué dans la formation des protéines des canaux chlorure. Ueno et al. ont émis l'hypothèse d'un lien étroit entre *CLIC2* et l'entretien des jonctions serrées ZO-1 et CL-1 en raison d'une diminution de son expression dans les cancers colorectaux (Ueno et al. 2019). Ces résultats sont cohérents avec les nôtres puisque Caco-2 est une lignée cancéreuse colorectale et nous retrouvons une sous expression de ce gène.

Les *MUC4* ou *MUC16* sont les gènes codant pour les mucines, des protéines constitutives du mucus au niveau de la barrière intestinale. *MUC4* est un nouvel antigène tumoral dans l'immunothérapie du cancer du pancréas (Gautam et al. 2020). Il a montré son rôle dans la voie de signalisation de la résistance aux médicaments (Skrypek et al. 2013).

Bien que nous n'ayons pas montré d'effet statistiquement significatif de l'Atz et du Mtc sur la barrière intestinale, nos études transcriptomiques nous montrent qu'un stress cellulaire est présent. Cela nous conforte dans l'hypothèse que nous avons émise : les cocktails d'herbicides ont un impact sur l'intégrité des cellules épithéliales humaines. La légitimité de nos études est renforcée et, la mise en place des outils pour identifier et comprendre les potentiels effets de xénobiotiques, pourra donc servir de base à de futurs projets.

Un moyen d'étude qui permettrait de révéler l'effet des herbicides sur la barrière intestinale serait de mettre en place un modèle de barrière intestinale « pathologique ». Des études ont montré que des effets cytotoxiques de molécules avaient été détectés dans le cas d'un modèle Caco-2 inflammatoire alors que ces mêmes molécules étaient restées sans effet sur la monocouche contrôle non inflammée (Busch, Kämpfer, et Schins 2021). Peut-être serait-il possible que les herbicides deviennent délétères lorsque l'homéostasie de la barrière intestinale est perturbée. Dans ce contexte, une monocouche de Caco-2, cultivée sur Transwell, pourrait être soumise à un stress inflammatoire ou oxydatif simultanément à l'incubation des herbicides (Susewind et al. 2016).

## PARTIE 4 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

\*\*\*

La voie orale est la voie d'administration des médicaments la plus confortable pour le patient mais c'est aussi la voie la moins favorable au passage des agents thérapeutiques dans la circulation systémique (**Cf. bibliographie Chap 1\_1.**). Le pouvoir thérapeutique des molécules dans cette voie est limité par leurs caractéristiques physicochimiques. Les peptides et protéines thérapeutiques sont rapidement dégradés dans l'environnement acide de l'estomac ainsi que sous l'action des nombreuses enzymes présentes tout au long du tractus digestif (pepsine, pancréatine). D'autres agents sont peu perméables vis-à-vis des membranes biologiques et donc seront moins bien absorbés au niveau de la muqueuse intestinale (**Cf. bibliographie Chap 1\_2.1.**).

Lors de ce projet de thèse, nous avons investigué le comportement d'un agent à visée thérapeutique et diagnostique sur la barrière intestinale. La voie digestive possède des mécanismes de défense pour lutter contre les xénobiotiques (**Cf. bibliographie Chap 1\_1.3.**). Dans le cadre de l'ingestion d'un médicament, ces mécanismes de protection peuvent être un frein à l'administration orale de l'agent thérapeutique. Dans cette première partie du projet de thèse, nous avons déterminé les conséquences d'un passage de l'agent affitine dans le tractus digestif et nous avons modifié cette affitine pour lui permettre de rejoindre sa cible en limitant sa dégradation.

Les affitines sont des petites protéines artificielles d'affinité de 7 kDa. Elles combinent de nombreuses propriétés favorables, inaccessibles aux anticorps (**Cf. bibliographie Chap 2\_1.2.**). Particulièrement stables thermiquement et chimiquement, elles sont robustes et bien exprimées de façon recombinante. Il a déjà été montré qu'elles sont non immunogènes et qu'elles ont une biodistribution ainsi qu'une clairance rapide, adaptées à une utilisation *in vivo*. Or nous avons montré, à l'aide de milieux synthétiques (**Cf. bibliographie Chap 3\_1.1.**), que les affitines pourront difficilement être administrées par voie orale, considérant leur faible résistance aux protéases gastriques et intestinales.

Cependant, grâce à l'utilisation d'outils d'ingénierie protéique (**Cf. bibliographie Chap 3\_2.2.**), nous avons mis en évidence qu'une double mutation des résidus 6 et 7 des affitines en résidus Trp et Ile respectivement leur permet d'acquérir : une meilleure affinité avec leur cible, une résistance aux protéases au niveau du site modifié ainsi qu'un meilleur rendement de production. Les mutations introduites ont amélioré les fonctions de l'affitine tout en conservant leurs stabilités thermiques et face au pH qui les caractérisent. Les améliorations

que nous avons réussi à obtenir sont particulièrement recherchées dans le développement d'agents de ciblage en diagnostic et thérapie. Néanmoins, l'optimisation n'a pas été totale et deux autres sites sont toujours soumis à l'action des protéases.

Pour poursuivre le projet d'administrer les affitines par voie orale, différentes alternatives dans les méthodes d'administration existent (**Cf. bibliographie Chap 3\_2.1**). Une solution satisfaisante serait d'encapsuler les affitines dans un vecteur particulière lipidique ou polymérique (Damgé et al. 1988 ; Lollo et al. 2017). Cette solution assure la protection de l'affitine face aux protéases, la capsule augmente la cinétique de dissolution et peut améliorer l'absorption au travers de la muqueuse intestinale. Ces capsules nécessitent d'être constituées de matériaux biologiquement compatibles n'entraînant aucune réaction toxique, immunogène ou inflammatoire. Une autre solution est apportée par Wawrezinieck, la dégradation dans les fluides digestifs peut être limitée par l'administration simultanée d'inhibiteurs qui diminuent l'activité enzymatique du tractus gastro-intestinal (Wawrezinieck et al. 2008).

Les questions autour des facteurs environnementaux et de leur lien de causalité sur les pathologies chroniques de l'intestin sont un enjeu de santé publique (**Cf. bibliographie Chap 2\_2.**). Malgré les efforts de recherche mis en œuvre depuis une dizaine d'années, l'évaluation des risques liés aux facteurs environnementaux tels que l'exposition aux xénobiotiques manque de données robustes et prédictives.

Chez l'Homme, la voie principale d'exposition aux xénobiotiques est l'ingestion. L'intestin représente donc un organe clé pour caractériser l'absorption des xénobiotiques (**cf. bibliographie Chap 1\_1.1**). Pourtant, il existe peu de travaux s'intéressant aux effets des herbicides vis-à-vis de la barrière intestinale. De même, peu de travaux ont été réalisés sur les métabolites des herbicides ou sur leurs associations en cocktails (**Cf. bibliographie Chap 2\_2.2**). Il est donc nécessaire de mettre en place des projets de recherche qui vont dans ce sens. De plus, les travaux sur les altérations intestinales issues des effets des herbicides permettraient de mieux caractériser leur danger pour l'Homme suite à leur ingestion dans l'eau du robinet ou les aliments (**Cf. bibliographie Chap 2\_2.4**).

Dans la deuxième partie de thèse, nous avons choisi d'étudier deux herbicides, le métolachlore (Mtc) et l'atrazine (Atz), connus pour avoir des effets délétères sur la faune aquatique (**Cf. bibliographie Chap 2\_2.5**). Dans ce contexte, nous avons réalisé une étude de l'effet de ces herbicides, qui n'avait encore jamais été faite chez l'Homme, vis-à-vis de la barrière intestinale.

Nos travaux mettent en évidence que les 2 herbicides circulent dans le tractus digestif sans induire de cytotoxicité sur les cellules intestinales. Cependant, une absorption intestinale a été démontrée avec un premier passage rapide. La cinétique d'absorption est différente selon l'herbicide. L'Atz effectue un premier passage dans un temps très court (inférieur à 30 min), puis continue de traverser la barrière pour atteindre l'équilibre entre les deux compartiments dès 6 h d'incubation. Les résultats obtenus avec le Mtc sont différents puisque près d'un quart de la molécule a traversé la barrière à 6 h d'incubation mais nous n'avons pas d'absorption complète après 24 h. Ce passage des herbicides à travers la barrière intestinale suggère qu'ils atteignent rapidement la circulation systémique et sont capables de diffuser dans l'organisme. Nous ne pouvons donc pas exclure qu'ils induisent une cytotoxicité sur les cellules d'autres organes ou barrières.

La voie paracellulaire implique de nombreux acteurs pour maintenir une bonne perméabilité cellulaire. Un de ces acteurs correspond aux protéines de jonction. Les jonctions cellulaires servent à la cohésion des membranes plasmiques cellule-cellule et à la formation des canaux membranaires, favorisant les flux de composés de part et d'autre de la barrière intestinale (**Cf. bibliographie Chap 1\_3.3**). L'intégrité des jonctions cellulaires a été évaluée en suivant, à la fois l'expression protéique et l'expression génique de certaines jonctions serrées et d'adhérence. De plus, grâce à des outils innovants, nous avons montré que certains métabolites étaient responsables d'une augmentation de la prolifération et/ou de l'adhésion cellulaires. Enfin, notre étude transcriptomique révèle l'importance d'étudier en détail les effets produits par les cocktails puisque des sur- et sous-régulations géniques sont intervenues uniquement dans le cas des formulations contenant plusieurs herbicides et métabolites.

Ces travaux de thèse ont soulevé plusieurs nouvelles questions qu'il serait intéressant d'étudier. Pour déterminer quels mécanismes utilisent l'Atz et le Mtc pour traverser la barrière, nous pourrions étudier la voie transcellulaire en incubant les cellules avec un inhibiteur de la voie de l'endocytose (chloroquine, chlorpromazine) (Antileo et al. 2013). Un

milieu déplété en potassium bloque aussi l'internalisation des molécules médiée par la clathrine, en dissociant le réseau de clathrine qui est associé à la membrane plasmique (Ivanov 2008). La voie transcellulaire implique également des transporteurs à efflux qu'il est possible d'inhiber. Par exemple, le vérapamil permet de bloquer la pompe P-gp impliquée dans l'absorption intestinale (Y. Zhang et al. 2018). De plus, nous pourrions utiliser notre méthode d'immunomarquage directement sur les monocouches de cellules polarisées et ainsi mieux évaluer la localisation et la répartition des protéines de jonction sur la barrière en présence des herbicides.

Une étude préliminaire que nous menons est en charge d'évaluer le stress cellulaire induit par les herbicides. En effet, Chen et al ont montré que l'Atz favorisait la prolifération et les métastases des cellules EOC en induisant un faible niveau de ROS (J. Chen et al. 2021). Il est possible d'ajouter aux cultures cellulaires, le substrat 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate H<sub>2</sub>DCFDA qui, en présence de ROS, émettra un signal lumineux (Tampio et al. 2009). Des analyses en cytométrie en flux sur un grand nombre de cellules permettraient d'affiner les données quantitatives obtenues par l'approche Operetta. Nous envisageons également d'analyser par qPCR l'expression des enzymes de gestion du stress oxydatif telles que la glutathion peroxydase (Weydert et Cullen 2010).

Les résultats de séquençage nous ont apporté des informations précieuses sur la modulation des gènes par les herbicides. Des analyses plus poussées vont être réalisées pour comprendre la modulation des gènes par les cocktails. Il serait particulièrement intéressant de regarder par qPCR l'expression de EGR-1 et DUSP-1 par exemple. L'analyse par voie métabolique permettrait de valider les observations selon lesquelles la voie des MAP kinases serait impactée en cas d'exposition aux cocktails CM, CA et CT (Revest et al. 2005).

Les recherches effectuées dans le cadre de cette thèse s'inscrivent dans une démarche de compréhension des liens entre les facteurs environnementaux et l'expression de déséquilibres au niveau de la barrière intestinale. C'est pourquoi, une caractérisation des effets spécifiques aux métabolites permettrait de mieux définir le danger associé aux mélanges d'herbicides tels qu'ils sont retrouvés dans les conditions réelles d'exposition. Une meilleure connaissance des polluants appuyée par des résultats scientifiques quantifiables permettrait aux autorités compétentes d'évaluer les risques et de revoir les recommandations en conséquence.

Au-delà des réponses apportées aux problématiques des affinités et des polluants, ce projet de thèse cherchait avant tout à montrer l'intérêt d'utiliser des modèles *in vitro* dans les processus de screening de molécules. Les modèles *in vitro* sont nombreux (**Cf. bibliographie Chap 3\_3.3**). La complexité d'un modèle s'accompagne souvent d'une difficulté à le mettre en place au sein d'un laboratoire, d'un coût élevé et parfois d'un manque de reproductibilité. Pourtant, le besoin en modèles prédictifs, les plus fidèles possibles à la réalité, est croissant. L'emploi des cocultures, des cellules souches, des modèles cellulaires 3D ou dynamiques est constamment amélioré (**Annexe VI**). Pour respecter les impératifs de temps, de coût et de qualité, nous avons trouvé un équilibre entre un modèle cellulaire et des techniques de biologie moléculaire et de biochimie.

Le modèle cellulaire Caco-2 est un modèle simple, reproductible, qui peut être utilisé dans de nombreuses applications, et nous l'avons démontré dans le cas de la toxicité et la perméabilité cellulaire des xénobiotiques. A notre modèle prédictif, nous avons associé des outils permettant de comprendre les mécanismes impliqués dans les effets cellulaires (RNAseq, RT-qPCR, Western-blot, immunofluorescence). Dans notre problématique, ces mêmes outils peuvent nous permettre d'aller plus loin dans l'analyse et le screening des xénobiotiques.

Le tube digestif est le lieu d'inflammations causées, par exemple, par des déséquilibres liés au microbiote (**Cf. bibliographie Chap1\_2.2**). Une barrière intestinale déjà dérégulée ne pourra pas lutter aussi efficacement contre les xénobiotiques. Alors que notre modèle Caco-2 semble résilient face aux xénobiotiques que nous avons testés dans le cadre de cette thèse, un stress inflammatoire intestinal pourrait conduire à l'apparition d'une cytotoxicité de ces mêmes xénobiotiques sur une barrière déjà fragilisée. Diverses modifications peuvent améliorer les études sur les effets des xénobiotiques comme l'ajout de molécules inflammatoires et/ou l'utilisation d'organoïdes cultivés en monocouches cellulaires (**Cf. bibliographie Chap3\_3.4.2**).





## REFERENCES

- Abdayem, R., et M. Haftek. 2018. « Barrière épidermique ». *Annales de Dermatologie et de Vénérologie* 145 (4): 293-301. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2017.12.001>.
- Acuña, V., F. Bregoli, C. Font, D. Barceló, Ll. Corominas, A. Ginebreda, M. Petrovic, I. Rodríguez-Roda, S. Sabater, et R. Marcé. 2020. « Management Actions to Mitigate the Occurrence of Pharmaceuticals in River Networks in a Global Change Context ». *Environment International* 143 (octobre): 105993. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105993>.
- Adachi, Makoto, Yoko Hamazaki, Yuka Kobayashi, Masahiko Itoh, Sachiko Tsukita, Mikio Furuse, et Shoichiro Tsukita. 2009. « Similar and Distinct Properties of MUPP1 and Patj, Two Homologous PDZ Domain-Containing Tight-Junction Proteins ». *Molecular and Cellular Biology* 29 (9): 2372-89. <https://doi.org/10.1128/MCB.01505-08>.
- Adak, Atanu, et Mojibur R. Khan. 2019. « An Insight into Gut Microbiota and Its Functionalities ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 76 (3): 473-93. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2943-4>.
- Agostini, Lidiane P., Raquel S. Dettogni, Raquel S. Dos Reis, Elaine Stur, Eldamária V. W. Dos Santos, Diego P. Ventorim, Fernanda M. Garcia, Rodolfo C. Cardoso, Jones B. Graceli, et Lúri D. Louro. 2020. « Effects of Glyphosate Exposure on Human Health: Insights from Epidemiological and in Vitro Studies ». *The Science of the Total Environment* 705 (février): 135808. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135808>.
- Aguirre, T. a. S., D. Teijeiro-Osorio, M. Rosa, I. S. Coulter, M. J. Alonso, et D. J. Brayden. 2016. « Current Status of Selected Oral Peptide Technologies in Advanced Preclinical Development and in Clinical Trials ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 106 (Pt B): 223-41. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.02.004>.
- Ahlin, G., C. Hilgendorf, J. Karlsson, C. Szigartyo, M. Uhlén, et P. Artursson. 2009. « Endogenous Gene and Protein Expression of Drug-Transporting Proteins in Cell Lines Routinely Used in Drug Discovery Programs ». *Drug Metabolism and Disposition*. <https://doi.org/10.1124/dmd.109.028654>.
- Ahmad, Tanweer, Mohd Rafatullah, Arniza Ghazali, Othman Sulaiman, Rokiah Hashim, et Anees Ahmad. 2010. « Removal of Pesticides from Water and Wastewater by Different Adsorbents: A Review ». *Journal of Environmental Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews* 28 (4): 231-71. <https://doi.org/10.1080/10590501.2010.525782>.
- Ahn, Joomi, Min-Jie Cao, Ying Qing Yu, et John R. Engen. 2013. « Accessing the Reproducibility and Specificity of Pepsin and Other Aspartic Proteases ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1834 (6): 1222-29. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.10.003>.
- Ahonen, Mona Jasmine R., David B. Hill, et Mark H. Schoenfisch. 2019. « Nitric Oxide-Releasing Alginates as Mucolytic Agents ». *ACS Biomaterials Science & Engineering* 5 (7): 3409-18. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.9b00482>.
- Ak, Prashanth, et Arnold J. Levine. 2010. « P53 and NF-KB: Different Strategies for Responding to Stress Lead to a Functional Antagonism ». *The FASEB Journal* 24 (10): 3643-52. <https://doi.org/10.1096/fj.10-160549>.
- Akerfelt, Malin, Richard I. Morimoto, et Lea Sistonen. 2010. « Heat Shock Factors: Integrators of Cell Stress, Development and Lifespan ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (8): 545-55. <https://doi.org/10.1038/nrm2938>.
- Alexandre, Michele D., Beverly G. Jeansonne, Randall H. Renegar, Rodney Tatum, et Yan-Hua Chen. 2007. « The First Extracellular Domain of Claudin-7 Affects Paracellular Cl- Permeability ».

- Biochemical and Biophysical Research Communications* 357 (1): 87-91. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.03.078>.
- Alexandre, Michele D., Qun Lu, et Yan-Hua Chen. 2005. « Overexpression of Claudin-7 Decreases the Paracellular Cl<sup>-</sup> Conductance and Increases the Paracellular Na<sup>+</sup> Conductance in LLC-PK1 Cells ». *Journal of Cell Science* 118 (Pt 12): 2683-93. <https://doi.org/10.1242/jcs.02406>.
- Ali, Ayesha, HuiYing Tan, et Gerard E. Kaiko. 2020. « Role of the Intestinal Epithelium and Its Interaction With the Microbiota in Food Allergy ». *Frontiers in Immunology* 11: 604054. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.604054>.
- Ali, Joseph, Jong Bong Lee, Sally Gittings, Alessandro Iachelini, Joanne Bennett, Anne Cram, Martin Garnett, Clive J. Roberts, et Pavel Gershkovich. 2021. « Development and Optimisation of Simulated Salivary Fluid for Biorelevant Oral Cavity Dissolution ». *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 160 (mars): 125-33. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.01.017>.
- Allen, A., D. A. Hutton, J. P. Pearson, et L. A. Sellers. 1984. « Mucus Glycoprotein Structure, Gel Formation and Gastrointestinal Mucus Function ». *Ciba Foundation Symposium* 109: 137-56. <https://doi.org/10.1002/9780470720905.ch10>.
- Al-Missri, Murtaja Z., et Ishwarlal Jialal. 2021. « Physiology, Motilin ». In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545309/>.
- Alobeedallah, Hadeel, Jeff Ellis, Ramin Rohanzadeh, Hans Coster, et Fariba Dehghani. 2011. « Preparation of Nanostructured Hydroxyapatite in Organic Solvents for Clinical Applications ». *Trends in Biomaterials and Artificial Organs* 25 (janvier).
- Alves, Alcione Aparecida de Almeida, Giselle Louise de Oliveira Ruiz, Thyara Campos Martins Nonato, Laura Cecilia Müller, et Maurício Luiz Sens. 2019. « Performance of the fixed-bed of granular activated carbon for the removal of pesticides from water supply ». *Environmental Technology* 40 (15): 1977-87. <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1435731>.
- Amasheh, Salah, Noga Meiri, Alfred H. Gitter, Torsten Schöneberg, Joachim Mankertz, Jörg D. Schulzke, et Michael Fromm. 2002. « Claudin-2 Expression Induces Cation-Selective Channels in Tight Junctions of Epithelial Cells ». *Journal of Cell Science* 115 (Pt 24): 4969-76. <https://doi.org/10.1242/jcs.00165>.
- Amqam, Hasnawati, Dahlan Thalib, Daud Anwar, Saifuddin Sirajuddin, et Anwar Mallongi. 2020. « Human Health Risk Assessment of Heavy Metals via Consumption of Fish from Kao Bay ». *Reviews on Environmental Health* 35 (3): 257-63. <https://doi.org/10.1515/reveh-2020-0023>.
- Andreotti, Gabriella, Lifang Hou, Laura E. Beane Freeman, Rajeev Mahajan, Stella Koutros, Joseph Coble, Jay Lubin, Aaron Blair, Jane A. Hoppin, et Michael Alavanja. 2010. « Body Mass Index, Agricultural Pesticide Use, and Cancer Incidence in the Agricultural Health Study Cohort ». *Cancer Causes & Control: CCC* 21 (11): 1759-75. <https://doi.org/10.1007/s10552-010-9603-9>.
- Angelis, Isabella De, et Laura Turco. 2011. « Caco-2 Cells as a Model for Intestinal Absorption ». *Current Protocols in Toxicology* Chapter 20 (février): Unit20.6. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx2006s47>.
- Angelow, Susanne, Eveline E. Schneeberger, et Alan S. L. Yu. 2007. « Claudin-8 Expression in Renal Epithelial Cells Augments the Paracellular Barrier by Replacing Endogenous Claudin-2 ». *The Journal of Membrane Biology* 215 (2-3): 147-59. <https://doi.org/10.1007/s00232-007-9014-3>.
- Angkasekwina, Pornpimon, Heon Park, Yui-Hsi Wang, Yi-Hong Wang, Seon Hee Chang, David B. Corry, Yong-Jun Liu, Zhou Zhu, et Chen Dong. 2007. « Interleukin 25 Promotes the Initiation of

- Proallergic Type 2 Responses ». *The Journal of Experimental Medicine* 204 (7): 1509-17. <https://doi.org/10.1084/jem.20061675>.
- Antileo, Elmer, Carolina Garri, Victoria Tapia, Juan Pablo Muñoz, Mario Chiong, Francisco Nualart, Sergio Lavandero, Juan Fernández, et Marco T. Núñez. 2013. « Endocytic pathway of exogenous iron-loaded ferritin in intestinal epithelial (Caco-2) cells ». *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 304 (7): G655-61. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00472.2012>.
- Anuradha, Rajamanickam, Saravanan Munisankar, Yukthi Bhootra, Jeeva Jagannathan, Chandrakumar Dolla, Paul Kumaran, Thomas B. Nutman, et Subash Babu. 2016. « IL-10- and TGFβ-Mediated Th9 Responses in a Human Helminth Infection ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10 (1): e0004317. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004317>.
- Anway, Matthew D., Andrea S. Cupp, Mehmet Uzumcu, et Michael K. Skinner. 2005. « Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility ». *Science (New York, N.Y.)* 308 (5727): 1466-69. <https://doi.org/10.1126/science.1108190>.
- Arrieta, M. C., L. Bistritz, et J. B. Meddings. 2006. « Alterations in Intestinal Permeability ». *Gut* 55 (10): 1512-20. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.085373>.
- Artursson, P., et C. Magnusson. 1990. « Epithelial Transport of Drugs in Cell Culture. II: Effect of Extracellular Calcium Concentration on the Paracellular Transport of Drugs of Different Lipophilicities across Monolayers of Intestinal Epithelial (Caco-2) Cells ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 79 (7): 595-600. <https://doi.org/10.1002/jps.2600790710>.
- Artursson, P., A. L. Ungell, et J. E. Löfroth. 1993. « Selective Paracellular Permeability in Two Models of Intestinal Absorption: Cultured Monolayers of Human Intestinal Epithelial Cells and Rat Intestinal Segments ». *Pharmaceutical Research* 10 (8): 1123-29. <https://doi.org/10.1023/a:1018903931777>.
- Arumugam, Manimozhiyan, Jeroen Raes, Eric Pelletier, Denis Le Paslier, Takuji Yamada, Daniel R. Mende, Gabriel R. Fernandes, et al. 2011. « Enterotypes of the Human Gut Microbiome ». *Nature* 473 (7346): 174-80. <https://doi.org/10.1038/nature09944>.
- Asaka, Machiko, Tetsuaki Hirase, Aiko Hashimoto-Komatsu, et Koichi Node. 2011. « Rab5a-Mediated Localization of Claudin-1 Is Regulated by Proteasomes in Endothelial Cells ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 300 (1): C87-96. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00565.2010>.
- Auteri, Michelangelo, Maria Grazia Zizzo, et Rosa Serio. 2015. « GABA and GABA Receptors in the Gastrointestinal Tract: From Motility to Inflammation ». *Pharmacological Research* 93 (mars): 11-21. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2014.12.001>.
- Bäckhed, Fredrik, Hao Ding, Ting Wang, Lora V. Hooper, Gou Young Koh, Andras Nagy, Clay F. Semenkovich, et Jeffrey I. Gordon. 2004. « The Gut Microbiota as an Environmental Factor That Regulates Fat Storage ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (44): 15718-23. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407076101>.
- Bäckhed, Fredrik, Ruth E. Ley, Justin L. Sonnenburg, Daniel A. Peterson, et Jeffrey I. Gordon. 2005. « Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine ». *Science* 307 (5717): 1915-20. <https://doi.org/10.1126/science.1104816>.
- Banerjee, Amrita, Renwei Chen, Shamsul Arafin, et Samir Mitragotri. 2019. « Intestinal Iontophoresis from Mucoadhesive Patches: A Strategy for Oral Delivery ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 297 (mars): 71-78. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.01.037>.

- Barone, G., C. T. Chang, M. G. Choc, J. B. Klein, C. L. Marsh, J. A. Meligeni, D. I. Min, et al. 1996. « The Pharmacokinetics of a Microemulsion Formulation of Cyclosporine in Primary Renal Allograft Recipients. The Neoral Study Group ». *Transplantation* 61 (6): 875-80. <https://doi.org/10.1097/00007890-199603270-00005>.
- Barr, Dana Boyd, Cande V. Ananth, Xiaoyong Yan, Susan Lashley, John C. Smulian, Thomas A. Ledoux, Paromita Hore, et Mark G. Robson. 2010. « Pesticide Concentrations in Maternal and Umbilical Cord Sera and Their Relation to Birth Outcomes in a Population of Pregnant Women and Newborns in New Jersey ». *The Science of the Total Environment* 408 (4): 790-95. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.10.007>.
- Barriuso, E., et W. C. Koskinen. 1996. « Incorporating Nonextractable Atrazine Residues into Soil Size Fractions as a Function of Time ». *Soil Science Society of America Journal* 60 (1): 150-57. <https://doi.org/10.2136/sssaj1996.03615995006000010024x>.
- Bartfeld, Sina, Tülay Bayram, Marc van de Wetering, Meritxell Huch, Harry Begthel, Pekka Kujala, Robert Vries, Peter J. Peters, et Hans Clevers. 2015. « In Vitro Expansion of Human Gastric Epithelial Stem Cells and Their Responses to Bacterial Infection ». *Gastroenterology* 148 (1): 126-136.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.09.042>.
- Baumgartner, Werner. 2013. « Possible Roles of LI-Cadherin in the Formation and Maintenance of the Intestinal Epithelial Barrier ». *Tissue Barriers* 1 (1): e23815. <https://doi.org/10.4161/tisb.23815>.
- Baxevanis, Fotios, Jesse Kuiper, et Nikoletta Fotaki. 2018. « Strategic Drug Analysis in Fed-State Gastric Biorelevant Media Based on Drug Physicochemical Properties ». *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 127 (juin): 326-41. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.03.001>.
- Beaudoin, A. R., P. St-Jean, et G. Grondin. 1989. « Pancreatic Juice Composition: New Views about the Cellular Mechanisms That Control the Concentration of Digestive and Nondigestive Proteins ». *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)* 7 (4): 210-20. <https://doi.org/10.1159/000171221>.
- Becker, K. F., M. J. Atkinson, U. Reich, I. Becker, H. Nekarda, J. R. Siewert, et H. Höfler. 1994. « E-Cadherin Gene Mutations Provide Clues to Diffuse Type Gastric Carcinomas ». *Cancer Research* 54 (14): 3845-52.
- Bedford, R., C. Tiede, R. Hughes, A. Curd, M. J. McPherson, Michelle Peckham, et Darren C. Tomlinson. 2017. « Alternative Reagents to Antibodies in Imaging Applications ». *Biophysical Reviews* 9 (4): 299-308. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0278-2>.
- Bedos, C., L. Alletto, B. Durand, O. Fanucci, A. Brut, M. Bourdat-Deschamps, S. Giuliano, B. Loubet, E. Ceschia, et P. Benoit. 2017. « Observed Volatilization Fluxes of S-Metolachlor and Benoxacor Applied on Soil with and without Crop Residues ». *Environmental Science and Pollution Research International* 24 (4): 3985-96. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8124-9>.
- Béhar, Ghislaine, Marco Bellinzoni, Mike Maillason, Lauranne Paillard-Laurance, Pedro M. Alzari, Xuemei He, Barbara Mouratou, et Frédéric Pecorari. 2013. « Tolerance of the Archaeal Sac7d Scaffold Protein to Alternative Library Designs: Characterization of Anti-Immunoglobulin G Affitins ». *Protein Engineering, Design & Selection: PEDS* 26 (4): 267-75. <https://doi.org/10.1093/protein/gzs106>.
- Béhar, Ghislaine, Sabino Pacheco, Mike Maillason, Barbara Mouratou, et Frédéric Pecorari. 2014. « Switching an Anti-IgG Binding Site between Archaeal Extremophilic Proteins Results in Affitins with Enhanced PH Stability ». *Journal of Biotechnology* 192 Pt A (décembre): 123-29. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.10.006>.

- Béhar, Ghislaine, Axelle Renodon-Cornière, Stanimir Kambarev, Petar Vukojicic, Nathalie Caroff, Stéphane Corvec, Barbara Mouratou, et Frédéric Pecorari. 2019. « Whole-Bacterium Ribosome Display Selection for Isolation of Highly Specific Anti-Staphylococcus Aureus Affitins for Detection- and Capture-Based Biomedical Applications ». *Biotechnology and Bioengineering* 116 (8): 1844-55. <https://doi.org/10.1002/bit.26989>.
- Béhar, Ghislaine, Axelle Renodon-Cornière, Barbara Mouratou, et Frédéric Pecorari. 2016. « Affitins as Robust Tailored Reagents for Affinity Chromatography Purification of Antibodies and Non-Immunoglobulin Proteins ». *Journal of Chromatography. A* 1441 (avril): 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.02.068>.
- Behrens, I., P. Stenberg, P. Artursson, et T. Kissel. 2001. « Transport of Lipophilic Drug Molecules in a New Mucus-Secreting Cell Culture Model Based on HT29-MTX Cells ». *Pharmaceutical Research* 18 (8): 1138-45. <https://doi.org/10.1023/a:1010974909998>.
- Ben-Yosef, Tamar, Inna A. Belyantseva, Thomas L. Saunders, Elizabeth D. Hughes, Kohei Kawamoto, Christina M. Van Itallie, Lisa A. Beyer, et al. 2003. « Claudin 14 Knockout Mice, a Model for Autosomal Recessive Deafness DFNB29, Are Deaf Due to Cochlear Hair Cell Degeneration ». *Human Molecular Genetics* 12 (16): 2049-61. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg210>.
- Bérubé, Virginie E., Monique H. Boily, Christian DeBlois, Nathalie Dassylva, et Philip A. Spear. 2005. « Plasma Retinoid Profile in Bullfrogs, *Rana Catesbeiana*, in Relation to Agricultural Intensity of Sub-Watersheds in the Yamaska River Drainage Basin, Québec, Canada ». *Aquatic Toxicology* 71 (2): 109-20. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.10.018>.
- Beumer, Joep, et Hans Clevers. 2016. « Regulation and Plasticity of Intestinal Stem Cells during Homeostasis and Regeneration ». *Development* 143 (20): 3639-49. <https://doi.org/10.1242/dev.133132>.
- Beyer, Eric C., et Viviana M. Berthoud. 2018. « Gap Junction Gene and Protein Families: Connexins, Innexins, and Pannexins ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Biomembranes* 1860 (1): 5-8. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.05.016>.
- Binkley, Neil, Michael Bolognese, Anna Sidorowicz-Bialynicka, Tasneem Vally, Richard Trout, Colin Miller, Christine E. Buben, James P. Gilligan, David S. Krause, et Oral Calcitonin in Postmenopausal Osteoporosis (ORACAL) Investigators. 2012. « A Phase 3 Trial of the Efficacy and Safety of Oral Recombinant Calcitonin: The Oral Calcitonin in Postmenopausal Osteoporosis (ORACAL) Trial ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 27 (8): 1821-29. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1602>.
- Birrer, Michael J., Kathleen N. Moore, Ilaria Betella, et Richard C. Bates. 2019. « Antibody-Drug Conjugate-Based Therapeutics: State of the Science ». *Journal of the National Cancer Institute* 111 (6): 538-49. <https://doi.org/10.1093/jnci/djz035>.
- Björkman, Sven. 2002. « Prediction of the Volume of Distribution of a Drug: Which Tissue-Plasma Partition Coefficients Are Needed? ». *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 54 (9): 1237-45. <https://doi.org/10.1211/002235702320402080>.
- Blanchette, Marie, et Richard Daneman. 2015. « Formation and Maintenance of the BBB ». *Mechanisms of Development, Neurovascular unit*, 138 (novembre): 8-16. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2015.07.007>.
- Boelee, Eline, Gertjan Geerling, Bas van der Zaan, Anouk Blauw, et A. Dick Vethaak. 2019. « Water and Health: From Environmental Pressures to Integrated Responses ». *Acta Tropica* 193 (mai): 217-26. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.03.011>.

- Boersma, Ykelien L., Ginger Chao, Daniel Steiner, K. Dane Wittrup, et Andreas Plückthun. 2011. « Bispecific Designed Ankyrin Repeat Proteins (DARPs) Targeting Epidermal Growth Factor Receptor Inhibit A431 Cell Proliferation and Receptor Recycling ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (48): 41273-85. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.293266>.
- Böhmig, Georg A., Farsad Eskandary, Konstantin Doberer, et Philip F. Halloran. 2019. « The Therapeutic Challenge of Late Antibody-Mediated Kidney Allograft Rejection ». *Transplant International: Official Journal of the European Society for Organ Transplantation* 32 (8): 775-88. <https://doi.org/10.1111/tri.13436>.
- Boim, Alexys Giorgia Friol, Joanna Wragg, Solange Guidolin Canniatti-Brazaca, et Luís Reynaldo Ferracciú Alleoni. 2019. « Human Intestinal Caco-2 Cell Line in Vitro Assay to Evaluate the Absorption of Cd, Cu, Mn and Zn from Urban Environmental Matrices ». *Environmental Geochemistry and Health*, août. <https://doi.org/10.1007/s10653-019-00394-4>.
- Bokkers, Bas G. H., et Wout Slob. 2007. « Deriving a Data-Based Interspecies Assessment Factor Using the NOAEL and the Benchmark Dose Approach ». *Critical Reviews in Toxicology* 37 (5): 355-73. <https://doi.org/10.1080/10408440701249224>.
- Bonate, P. L., K. Reith, et S. Weir. 1998. « Drug Interactions at the Renal Level. Implications for Drug Development ». *Clinical Pharmacokinetics* 34 (5): 375-404. <https://doi.org/10.2165/00003088-199834050-00004>.
- Borlak, J., et C. Zwadlo. 2003. « Expression of Drug-Metabolizing Enzymes, Nuclear Transcription Factors and ABC Transporters in Caco-2 Cells ». *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems* 33 (9): 927-43. <https://doi.org/10.1080/00498250310001614286>.
- Bourriaud, C., R. J. Robins, L. Martin, F. Kozlowski, E. Tenailleau, C. Cherbut, et C. Michel. 2005. « Lactate Is Mainly Fermented to Butyrate by Human Intestinal Microfloras but Inter-Individual Variation Is Evident ». *Journal of Applied Microbiology* 99 (1): 201-12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02605.x>.
- Braga, Ricardo Luís Lopes, Ana Claudia Machado Pereira, Andréa Fonseca Ferreira, Ana Cláudia de Paula Rosa, et Wânia Ferraz Pereira-Manfro. 2018. « INTRACELLULAR PERSISTENCE OF ENTEROAGGREGATIVE ESCHERICHIA COLI INDUCES A PROINFLAMMATORY CYTOKINES SECRETION IN INTESTINAL EPITHELIAL T84 CELLS ». *Arquivos De Gastroenterologia* 55 (2): 133-37. <https://doi.org/10.1590/S0004-2803.201800000-23>.
- Branca, Jacopo J. V., Massimo Gulisano, et Claudio Nicoletti. 2019. « Intestinal Epithelial Barrier Functions in Ageing ». *Ageing Research Reviews* 54: 100938. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2019.100938>.
- Brightman, M. W. 1977. « Morphology of Blood-Brain Interfaces ». *Experimental Eye Research* 25 Suppl: 1-25. [https://doi.org/10.1016/s0014-4835\(77\)80008-0](https://doi.org/10.1016/s0014-4835(77)80008-0).
- Briske-Anderson, M. J., J. W. Finley, et S. M. Newman. 1997. « The Influence of Culture Time and Passage Number on the Morphological and Physiological Development of Caco-2 Cells ». *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 214 (3): 248-57. <https://doi.org/10.3181/00379727-214-44093>.
- Brokhan, Irina, Jie Xu, Brenda L. K. Coles, Rozita Razavi, Silvia Engert, Heiko Lickert, Robert Babona-Pilipos, et al. 2019. « Dual Embryonic Origin of the Mammalian Enteric Nervous System ». *Developmental Biology* 445 (2): 256-70. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.11.014>.
- Bruno, Giovanni, Piera Zaccari, Giulia Rocco, Giulia Scalese, Cristina Panetta, Barbara Porowska, Stefano Pontone, et Carola Severi. 2019. « Proton Pump Inhibitors and Dysbiosis: Current

- Knowledge and Aspects to Be Clarified ». *World Journal of Gastroenterology* 25 (22): 2706-19. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i22.2706>.
- Buckley, Craig D., Jiongyi Tan, Karen L. Anderson, Dorit Hanein, Niels Volkmann, William I. Weis, W. James Nelson, et Alexander R. Dunn. 2014. « Cell Adhesion. The Minimal Cadherin-Catenin Complex Binds to Actin Filaments under Force ». *Science (New York, N.Y.)* 346 (6209): 1254211. <https://doi.org/10.1126/science.1254211>.
- Buddelmeijer, Nienke, Martin Krehenbrink, Frédéric Pecorari, et Anthony P. Pugsley. 2009. « Type II Secretion System Secretin PulD Localizes in Clusters in the Escherichia Coli Outer Membrane ». *Journal of Bacteriology* 191 (1): 161-68. <https://doi.org/10.1128/JB.01138-08>.
- Burrello, Claudia, Maria Rita Giuffrè, Angeli Dominique Macandog, Angelica Diaz-Basabe, Fulvia Milena Cribiù, Gianluca Lopez, Francesca Borgo, et al. 2019. « Fecal Microbiota Transplantation Controls Murine Chronic Intestinal Inflammation by Modulating Immune Cell Functions and Gut Microbiota Composition ». *Cells* 8 (6): E517. <https://doi.org/10.3390/cells8060517>.
- Burton, Julien, Andrew P. Worth, Ivanka Tsakovska, et Antonia Diukendjieva. 2016. « In Silico Models for Acute Systemic Toxicity ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1425: 177-200. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3609-0\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3609-0_10).
- Busch, Mathias, Angela A. M. Kämpfer, et Roel P. F. Schins. 2021. « An Inverted in Vitro Triple Culture Model of the Healthy and Inflamed Intestine: Adverse Effects of Polyethylene Particles ». *Chemosphere* 284 (décembre): 131345. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131345>.
- Butler, James M., et Jennifer B. Dressman. 2010. « The Developability Classification System: Application of Biopharmaceutics Concepts to Formulation Development ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 99 (12): 4940-54. <https://doi.org/10.1002/jps.22217>.
- Butt, Azeem Mehmood, Ishaque Badshah Khan, Mureed Hussain, Muhammad Idress, Jun Lu, et Yigang Tong. 2012. « Role of Post Translational Modifications and Novel Crosstalk between Phosphorylation and O-Beta-GlcNAc Modifications in Human Claudin-1, -3 and -4 ». *Molecular Biology Reports* 39 (2): 1359-69. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-0870-7>.
- Cai, Hongliang, Chad Stoner, Anita Reddy, Sascha Freiwald, Danielle Smith, Roger Winters, Charles Stankovic, et Narayanan Surendran. 2006. « Evaluation of an Integrated in Vitro-in Silico PBPK (Physiologically Based Pharmacokinetic) Model to Provide Estimates of Human Bioavailability ». *International Journal of Pharmaceutics* 308 (1-2): 133-39. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.11.002>.
- Cai, Wei-Dan, Hui-Jun Liu, et Zhi-Guo Fang. 2012. « [Toxicity effects of Rac- and S-metolachlor on two algae] ». *Huan Jing Ke Xue= Huanjing Kexue* 33 (2): 448-53.
- Calvet, Raoul, Enrique Barriuso, Carole Bedos, Pierre Benoit, Marie-Paule Charnay, et Yves Coquet. 2005. *Les pesticides dans les sols. Conséquences agronomiques et environnementales*.
- Cano-Cebrián, María José, Teodoro Zornoza, Luis Granero, et Ana Polache. 2005. « Intestinal Absorption Enhancement via the Paracellular Route by Fatty Acids, Chitosans and Others: A Target for Drug Delivery ». *Current Drug Delivery* 2 (1): 9-22. <https://doi.org/10.2174/1567201052772834>.
- Caputi, Valentina, et Maria Cecilia Giron. 2018. « Microbiome-Gut-Brain Axis and Toll-Like Receptors in Parkinson's Disease ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (6): E1689. <https://doi.org/10.3390/ijms19061689>.
- Castellanos-Gonzalez, Alejandro, Miguel M. Cabada, Joan Nichols, Guillermo Gomez, et A. Clinton White. 2013. « Human Primary Intestinal Epithelial Cells as an Improved in Vitro Model for

- Cryptosporidium Parvum Infection ». *Infection and Immunity* 81 (6): 1996-2001. <https://doi.org/10.1128/IAI.01131-12>.
- Catanzano, F., G. Graziano, P. Fusi, P. Tortora, et G. Barone. 1998. « Differential Scanning Calorimetry Study of the Thermodynamic Stability of Some Mutants of Sso7d from *Sulfolobus Solfataricus* ». *Biochemistry* 37 (29): 10493-98. <https://doi.org/10.1021/bi972994k>.
- Catron, Tara R., Adam Swank, Leah C. Wehmas, Drake Phelps, Scott P. Keely, Nichole E. Brinkman, James McCord, et al. 2019. « Microbiota Alter Metabolism and Mediate Neurodevelopmental Toxicity of 17 $\beta$ -Estradiol ». *Scientific Reports* 9 (1): 7064. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43346-9>.
- Cavas, Tolga. 2011. « In Vivo Genotoxicity Evaluation of Atrazine and Atrazine-Based Herbicide on Fish *Carassius Auratus* Using the Micronucleus Test and the Comet Assay ». *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 49 (6): 1431-35. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.03.038>.
- Çetin, İdil, et Mehmet R. Topçul. 2019. « Evaluation of the Cytotoxic Effect of Ly2109761 on HeLa Cells Using the XCELLigence RTCA System ». *Oncology Letters* 17 (1): 683-87. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9556>.
- Chamakura, Karthik R., Jennifer S. Tran, Chandler O'Leary, Hannah G. Lisciandro, Sophia F. Antillon, Kameron D. Garza, Elizabeth Tran, Lorna Min, et Ry Young. 2020. « Rapid de Novo Evolution of Lysis Genes in Single-Stranded RNA Phages ». *Nature Communications* 11 (1): 6009. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19860-0>.
- Charpentier, Maud, Mikael Croyal, Delphine Carbone, Agnès Fortun, Laetitia Florenceau, Catherine Rabu, Michel Krempf, Nathalie Labarrière, et François Lang. 2016. « IRES-Dependent Translation of the Long Non Coding RNA Meloe in Melanoma Cells Produces the Most Immunogenic MELOE Antigens ». *Oncotarget* 7 (37): 59704-13. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10923>.
- Chauncey, Howard. H. 1961. « Salivary Enzymes ». *The Journal of the American Dental Association* 63 (3): 360-68. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1961.0215>.
- Chen, Huang-Chi, et Yu-Chen Hu. 2006. « Bioreactors for Tissue Engineering ». *Biotechnology Letters* 28 (18): 1415-23. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9111-x>.
- Chen, Junyu, Jian Liu, Shan Wu, Wei Liu, Yang Xia, Jing Zhao, Yanrong Yang, Yuan Wang, Yuanqing Peng, et Shuhua Zhao. 2021. « Atrazine Promoted Epithelial Ovarian Cancer Cells Proliferation and Metastasis by Inducing Low Dose Reactive Oxygen Species (ROS) ». *Iranian Journal of Biotechnology* 19 (2): e2623. <https://doi.org/10.30498/IJB.2021.2623>.
- Chen, Lihong, Biguang Tuo, et Hui Dong. 2016. « Regulation of Intestinal Glucose Absorption by Ion Channels and Transporters ». *Nutrients* 8 (1): E43. <https://doi.org/10.3390/nu8010043>.
- Chen, Shuai, Ralf Einspanier, et Jennifer Schoen. 2015. « Transepithelial electrical resistance (TEER): a functional parameter to monitor the quality of oviduct epithelial cells cultured on filter supports ». *Histochemistry and Cell Biology* 144 (5): 509-15. <https://doi.org/10.1007/s00418-015-1351-1>.
- Chen, Yanling, Bingwen Lu, Qingkai Yang, Colleen Fearn, John R. Yates, et Jiing-Dwan Lee. 2009. « Combined Integrin Phosphoproteomic Analyses and Small Interfering RNA--Based Functional Screening Identify Key Regulators for Cancer Cell Adhesion and Migration ». *Cancer Research* 69 (8): 3713-20. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2515>.

- Cheng, K.-C., Cheng Li, et Annette S. Uss. 2008. « Prediction of Oral Drug Absorption in Humans--from Cultured Cell Lines and Experimental Animals ». *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 4 (5): 581-90. <https://doi.org/10.1517/17425255.4.5.581>.
- Cherradi, S., A. Ayrolles-Torro, N. Vezzo-Vié, N. Gueguinou, V. Denis, E. Combes, F. Boissière, et al. 2017. « Antibody Targeting of Claudin-1 as a Potential Colorectal Cancer Therapy ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 36 (1): 89. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0558-5>.
- Chiang, Po-Chang, Jia Liu, Peter Fan, et Harvey Wong. 2018. « Exploring a Kinetic Model Approach in Biopharmaceutics: Estimating the Fraction Absorbed of Orally Administered Drugs in Humans ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 107 (7): 1798-1805. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.03.015>.
- Chiu, Chih-Hao, Kin Fong Lei, Wen-Ling Yeh, Poyu Chen, Yi-Sheng Chan, Kuo-Yao Hsu, et Alvin Chao-Yu Chen. 2017. « Comparison between xCELLigence biosensor technology and conventional cell culture system for real-time monitoring human tenocytes proliferation and drugs cytotoxicity screening ». *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 12 (octobre): 149. <https://doi.org/10.1186/s13018-017-0652-6>.
- Cho, Kichul, Chang Seon Ryu, Seongho Jeong, et Youngjun Kim. 2020. « Potential Adverse Effect of Tyrosinase Inhibitors on Teleosts:A Review ». *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP* 228 (février): 108655. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108655>.
- Choi, Hee-Jung, Julia C. Gross, Sabine Pokutta, et William I. Weis. 2009. « Interactions of Plakoglobin and Beta-Catenin with Desmosomal Cadherins: Basis of Selective Exclusion of Alpha- and Beta-Catenin from Desmosomes ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (46): 31776-88. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.047928>.
- Cinier, Mathieu, Marc Petit, Monique N. Williams, Roxane M. Fabre, Frédéric Pecorari, Daniel R. Talham, Bruno Bujoli, et Charles Tellier. 2009. « Bisphosphonate Adaptors for Specific Protein Binding on Zirconium Phosphonate-Based Microarrays ». *Bioconjugate Chemistry* 20 (12): 2270-77. <https://doi.org/10.1021/bc9002597>.
- Clevers, Hans. 2013. « The Intestinal Crypt, a Prototype Stem Cell Compartment ». *Cell* 154 (2): 274-84. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.004>.
- Colegio, Oscar R., Christina M. Van Itallie, Heather J. McCrea, Christoph Rahner, et James Melvin Anderson. 2002. « Claudins Create Charge-Selective Channels in the Paracellular Pathway between Epithelial Cells ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 283 (1): C142-147. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00038.2002>.
- Coleman, Olivia I., et Dirk Haller. 2019. « ER Stress and the UPR in Shaping Intestinal Tissue Homeostasis and Immunity ». *Frontiers in Immunology* 10: 2825. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02825>.
- Cook, Michelle E., et Paul A. Moore. 2008. « The Effects of the Herbicide Metolachlor on Agonistic Behavior in the Crayfish, *Orconectes Rusticus* ». *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 55 (1): 94-102. <https://doi.org/10.1007/s00244-007-9088-z>.
- Correa, Agustín, Sabino Pacheco, Ariel E. Mechaly, Gonzalo Obal, Ghislaine Béhar, Barbara Mouratou, Pablo Oppezzo, Pedro M. Alzari, et Frédéric Pecorari. 2014a. « Potent and Specific Inhibition of Glycosidases by Small Artificial Binding Proteins (Affitins) ». *PLoS One* 9 (5): e97438. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097438>.
- Costa, M. 2004. « How Many Kinds of Visceral Afferents? » *Gut* 53 (90002): 1ii-4. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.033407>.

- Courau, Tristan, Julie Bonnereau, Justine Chicoteau, Hugo Bottois, Romain Remark, Laura Assante Miranda, Antoine Toubert, et al. 2019. « Cocultures of Human Colorectal Tumor Spheroids with Immune Cells Reveal the Therapeutic Potential of MICA/B and NKG2A Targeting for Cancer Treatment ». *Journal for Immunotherapy of Cancer* 7 (1): 74. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0553-9>.
- Crenn, Pascal, Bernard Messing, et Luc Cynober. 2008. « Citrulline as a Biomarker of Intestinal Failure Due to Enterocyte Mass Reduction ». *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)* 27 (3): 328-39. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2008.02.005>.
- Cukrowska, Bożena, Joanna B. Bierała, Magdalena Zakrzewska, Mark Klukowski, et Elżbieta Maciorkowska. 2020. « The Relationship between the Infant Gut Microbiota and Allergy. The Role of Bifidobacterium Breve and Prebiotic Oligosaccharides in the Activation of Anti-Allergic Mechanisms in Early Life ». *Nutrients* 12 (4): E946. <https://doi.org/10.3390/nu12040946>.
- Curwin, Brian D., Misty J. Hein, Dana B. Barr, et Cynthia Striley. 2010. « Comparison of Immunoassay and HPLC-MS/MS Used to Measure Urinary Metabolites of Atrazine, Metolachlor, and Chlorpyrifos from Farmers and Non-Farmers in Iowa ». *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology* 20 (2): 205-12. <https://doi.org/10.1038/jes.2009.15>.
- Daeihamed, Marjan, Simin Dadashzadeh, Azadeh Haeri, et Masoud Faghieh Akhlaghi. 2017. « Potential of Liposomes for Enhancement of Oral Drug Absorption ». *Current Drug Delivery* 14 (2): 289-303. <https://doi.org/10.2174/1567201813666160115125756>.
- Daggett, Kelly A., Mark Layer, et T. Ashton Cropp. 2009. « A General Method for Scanning Unnatural Amino Acid Mutagenesis ». *ACS Chemical Biology* 4 (2): 109-13. <https://doi.org/10.1021/cb800271f>.
- Dalton, Shana R., Richard T. Miller, et Sharon A. Meyer. 2003. « The Herbicide Metolachlor Induces Liver Cytochrome P450s 2B1/2 and 3A1/2, but Not Thyroxine-Uridine Dinucleotide Phosphate Glucuronosyltransferase and Associated Thyroid Gland Activity ». *International Journal of Toxicology* 22 (4): 287-95. <https://doi.org/10.1080/10915810305121>.
- Damgé, Christiane, Christine Michel, Marc Aprahamian, et Patrick Couvreur. 1988. « New Approach for Oral Administration of Insulin With Polyalkylcyanoacrylate Nanocapsules as Drug Carrier ». *Diabetes* 37 (2): 246-51. <https://doi.org/10.2337/diab.37.2.246>.
- Dammico, Sylvestre, Marine Goux, Christian Lemaire, Guillaume Becker, Mohamed Ali Bahri, Alain Plenevaux, Mathieu Cinier, et André Luxen. 2017. « Regiospecific Radiolabelling of Nanofitin on Ni Magnetic Beads with [18F]FBEM and in Vivo PET Studies ». *Nuclear Medicine and Biology* 51 (août): 33-39. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2017.04.006>.
- Danielsen, E. M., G. M. Cowell, et S. S. Poulsen. 1983. « Biosynthesis of Intestinal Microvillar Proteins. Role of the Golgi Complex and Microtubules ». *The Biochemical Journal* 216 (1): 37-42. <https://doi.org/10.1042/bj2160037>.
- Danielson, P. B. 2002. « The Cytochrome P450 Superfamily: Biochemistry, Evolution and Drug Metabolism in Humans ». *Current Drug Metabolism* 3 (6): 561-97. <https://doi.org/10.2174/1389200023337054>.
- De Genst, Erwin, Karen Silence, Klaas Decanniere, Katja Conrath, Remy Loris, Jörg Kinne, Serge Muyldermans, et Lode Wyns. 2006. « Molecular Basis for the Preferential Cleft Recognition by Dromedary Heavy-Chain Antibodies ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (12): 4586-91. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505379103>.
- De Mey, Marjan, Gaspard J. Lequeux, Jo Maertens, Cassandra I. De Muynck, Wim K. Soetaert, et Erick J. Vandamme. 2008. « Comparison of Protein Quantification and Extraction Methods Suitable

- for E. Coli Cultures ». *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization* 36 (3): 198-202. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2007.10.001>.
- De Oliveira, Julie, Edith Chadili, Benjamin Piccini, Cyril Turies, Emmanuelle Maillot-Maréchal, Olivier Palluel, Patrick Pardon, et al. 2020. « Refinement of an OECD Test Guideline for Evaluating the Effects of Endocrine Disrupting Chemicals on Aromatase Gene Expression and Reproduction Using Novel Transgenic Cyp19a1a-EGFP Zebrafish ». *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 220 (mars): 105403. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105403>.
- Dearfield, Kerry L, Nancy E McCarroll, Alberto Protzel, H. Frank Stack, Marcus A Jackson, et Michael D Waters. 1999. « A Survey of EPA/OPP and Open Literature on Selected Pesticide Chemicals: II. Mutagenicity and Carcinogenicity of Selected Chloroacetanilides and Related Compounds1This Manuscript Has Been Reviewed by the Office of Research and Development, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, and the National Health and Environmental Effects Research Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, and Approved for Publication. Approval Does Not Signify That the Contents Necessarily Reflect the Views or Policies of the Agency, nor Does Mention of Trade Names or Commercial Products Constitute Endorsement or Recommendation for Use.1 ». *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 443 (1): 183-221. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(99\)00019-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(99)00019-8).
- Deng, Feiyang, et You Han Bae. 2020. « Bile Acid Transporter-Mediated Oral Drug Delivery ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 327 (novembre): 100-116. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.07.034>.
- Derde, Melanie, Véronique Vié, Astrid Walrant, Sandrine Sagan, Valérie Lechevalier, Catherine Guérin-Dubiard, Stéphane Pezennec, et al. 2017. « Antimicrobial Activity of Lysozyme Isoforms: Key Molecular Features ». *Biopolymers* 107 (12). <https://doi.org/10.1002/bip.23040>.
- Deshayes, S., V. Eudes, M. Bigourie, C. Droguet, et R. Moilleron. 2015. « Caractérisation des eaux grises (II). Cas des alkylphénols et des phtalates ». *Techniques Sciences Méthodes*, n° 12 (décembre): 68-86. <https://doi.org/10.1051/tsm/201512068>.
- Deuschle, Friedrich-Christian, Elena Ilyukhina, et Arne Skerra. 2021. « Anticalin® proteins: from bench to bedside ». *Expert Opinion on Biological Therapy* 21 (4): 509-18. <https://doi.org/10.1080/14712598.2021.1839046>.
- Devriese, Sarah, Lien Van den Bossche, Sophie Van Welden, Tom Holvoet, Iris Pinheiro, Pieter Hindryckx, Martine De Vos, et Debby Laukens. 2017. « T84 Monolayers Are Superior to Caco-2 as a Model System of Colonocytes ». *Histochemistry and Cell Biology* 148 (1): 85-93. <https://doi.org/10.1007/s00418-017-1539-7>.
- Di Domenico, Enea Gino, Ilaria Cavallo, Bruno Capitano, Fiorentina Ascenzioni, Fulvia Pimpinelli, Aldo Morrone, et Fabrizio Ensoli. 2019. « Staphylococcus aureus and the Cutaneous Microbiota Biofilms in the Pathogenesis of Atopic Dermatitis ». *Microorganisms* 7 (9): 301. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090301>.
- Di, Li. 2015. « Strategic Approaches to Optimizing Peptide ADME Properties ». *The AAPS Journal* 17 (1): 134-43. <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9687-3>.
- Díaz de Barboza, Gabriela, Solange Guizzardi, Luciana Moine, et Nori Tolosa de Talamoni. 2017. « Oxidative Stress, Antioxidants and Intestinal Calcium Absorption ». *World Journal of Gastroenterology* 23 (16): 2841-53. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i16.2841>.
- Díaz, Lorenza, Elena Zambrano, María E. Flores, Mariela Contreras, José C. Crispín, Gabriela Alemán, César Bravo, et al. 2020. « Ethical Considerations in Animal Research: The Principle of 3R's ».

- Revista De Investigacion Clinica; Organo Del Hospital De Enfermedades De La Nutricion* 73 (4): 199-209. <https://doi.org/10.24875/RIC.20000380>.
- Dickinson, Paul A., Ragheb Abu Rmaileh, Lee Ashworth, Richard A. Barker, Wendy M. Burke, Claire M. Patterson, Nick Stainforth, et Mohammed Yasin. 2012. « An Investigation into the Utility of a Multi-Compartmental, Dynamic, System of the Upper Gastrointestinal Tract to Support Formulation Development and Establish Bioequivalence of Poorly Soluble Drugs ». *The AAPS Journal* 14 (2): 196-205. <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9333-x>.
- Dickson, Robert P., John R. Erb-Downward, Fernando J. Martinez, et Gary B. Huffnagle. 2016. « The Microbiome and the Respiratory Tract ». *Annual review of physiology* 78 (février): 481-504. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105238>.
- Dinelli, G., C. Accinelli, A. Vicari, et P. Catizone. 2000. « Comparison of the Persistence of Atrazine and Metolachlor under Field and Laboratory Conditions ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (7): 3037-43. <https://doi.org/10.1021/jf991057b>.
- Dionigi, Lamberto, Francesco Ragonese, Lorenzo Monarca, Stefano Covino, Antonella de Luca, Rossana G. Iannitti, Federica Bastioli, Anargyros N. Moulas, Marcello Allegretti, et Bernard Fioretti. 2020. « Focus on the Use of Resveratrol as an Adjuvant in Glioblastoma Therapy ». *Current Pharmaceutical Design* 26 (18): 2102-8. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200401085634>.
- Diwakarla, S., L. J. Fothergill, J. Fakhry, B. Callaghan, et J. B. Furness. 2017. « Heterogeneity of Enterochromaffin Cells within the Gastrointestinal Tract ». *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 29 (6). <https://doi.org/10.1111/nmo.13101>.
- Dixon, J. Brandon, Sandeep Raghunathan, et Melody A. Swartz. 2009. « A Tissue-Engineered Model of the Intestinal Lacteal for Evaluating Lipid Transport by Lymphatics ». *Biotechnology and Bioengineering* 103 (6): 1224-35. <https://doi.org/10.1002/bit.22337>.
- Djelloul, S., M. E. Fogue-Lafitte, B. Hermelin, M. Mareel, E. Bruyneel, A. Baldi, A. Giordano, E. Chastre, et C. Gespach. 1997. « Enterocyte Differentiation Is Compatible with SV40 Large T Expression and Loss of P53 Function in Human Colonic Caco-2 Cells. Status of the PRb1 and PRb2 Tumor Suppressor Gene Products ». *FEBS Letters* 406 (3): 234-42. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)00208-1](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)00208-1).
- Djouadi, Assia, et Touhami Lanez. 2021. « Evaluation de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de deux variétés de Solanum melongena L. de la région d'El-Oued par voltampérométrie cyclique et ondes carrées ».
- Dohán, Orsolya, et Nancy Carrasco. 2003. « Advances in Na(+)/I(-) Symporter (NIS) Research in the Thyroid and Beyond ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 213 (1): 59-70. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.10.059>.
- Dorato, Michael A., et Jeffery A. Engelhardt. 2005. « The No-Observed-Adverse-Effect-Level in Drug Safety Evaluations: Use, Issues, and Definition(s) ». *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP* 42 (3): 265-74. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2005.05.004>.
- Duan, Tianying, Onur Cil, Jay R. Thiagarajah, et Alan S. Verkman. 2019. « Intestinal Epithelial Potassium Channels and CFTR Chloride Channels Activated in ErbB Tyrosine Kinase Inhibitor Diarrhea ». *JCI Insight* 4 (4): 126444. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.126444>.
- Duerksen, D. R., C. Wilhelm-Boyles, et D. M. Parry. 2005. « Intestinal Permeability in Long-Term Follow-up of Patients with Celiac Disease on a Gluten-Free Diet ». *Digestive Diseases and Sciences* 50 (4): 785-90. <https://doi.org/10.1007/s10620-005-2574-0>.

- Edelmann, Martin R., et Simon Hauri. 2021. « Functional in Vitro Assessment of Modified Antibodies: Impact of Label on Protein Properties ». *PLOS ONE* 16 (9): e0257342. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257342>.
- Edler, Lutz, et Carina Ittrich. 2003. « Biostatistical Methods for the Validation of Alternative Methods for in Vitro Toxicity Testing ». *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA* 31 Suppl 1 (juin): 5-41. <https://doi.org/10.1177/026119290303101s02>.
- Egea, Tassia C., Roberto da Silva, Maurício Boscolo, Janaina Rigonato, Diego A. Monteiro, Danilo Grünig, Humberto da Silva, et al. 2017. « Diuron Degradation by Bacteria from Soil of Sugarcane Crops ». *Heliyon* 3 (12): e00471. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00471>.
- Ekwall, B. 1999. « Overview of the Final MEIC Results: II. The In Vitro--In Vivo Evaluation, Including the Selection of a Practical Battery of Cell Tests for Prediction of Acute Lethal Blood Concentrations in Humans ». *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 13 (4-5): 665-73. [https://doi.org/10.1016/s0887-2333\(99\)00061-2](https://doi.org/10.1016/s0887-2333(99)00061-2).
- Erokhova, Liudmila, Andreas Horner, Nicole Ollinger, Christine Siligan, et Peter Pohl. 2016. « The Sodium Glucose Cotransporter SGLT1 Is an Extremely Efficient Facilitator of Passive Water Transport ». *The Journal of Biological Chemistry* 291 (18): 9712-20. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.706986>.
- Escaffit, F., F. Boudreau, et J.-F. Beaulieu. 2005. « Differential Expression of Claudin-2 along the Human Intestine: Implication of GATA-4 in the Maintenance of Claudin-2 in Differentiating Cells ». *Journal of Cellular Physiology* 203 (1): 15-26. <https://doi.org/10.1002/jcp.20189>.
- Esterházy, Daria, Jakob Loschko, Mariya London, Veronica Jove, Thiago Y. Oliveira, et Daniel Mucida. 2016. « Classical Dendritic Cells Are Required for Dietary Antigen-Mediated Induction of Peripheral T(Reg) Cells and Tolerance ». *Nature Immunology* 17 (5): 545-55. <https://doi.org/10.1038/ni.3408>.
- Eyk, Armorel Diane van. 2015. « The effect of five artificial sweeteners on Caco-2, HT-29 and HEK-293 cells ». *Drug and Chemical Toxicology* 38 (3): 318-27. <https://doi.org/10.3109/01480545.2014.966381>.
- Fan, Gaowei, et Jinming Li. 2018. « Engineering Antibodies for the Treatment of Infectious Diseases ». *Recombinant Antibodies for Infectious Diseases* 1053 (mars): 207-20. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-72077-7\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-72077-7_10).
- Fan, Ming Z., James C. Matthews, Nadege M. P. Etienne, Barbara Stoll, Dale Lackeyram, et Douglas G. Burrin. 2004. « Expression of Apical Membrane L-Glutamate Transporters in Neonatal Porcine Epithelial Cells along the Small Intestinal Crypt-Villus Axis ». *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 287 (2): G385-398. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00232.2003>.
- Fanning, Alan S., Thomas Y. Ma, et James Melvin Anderson. 2002. « Isolation and Functional Characterization of the Actin Binding Region in the Tight Junction Protein ZO-1 ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16 (13): 1835-37. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0121fje>.
- Farquhar, Michelle J., Emma McCluskey, Ruth Staunton, Kevin R. Hughes, et Jennifer C. Coltherd. 2018. « Characterisation of a Canine Epithelial Cell Line for Modelling the Intestinal Barrier ». *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA* 46 (3): 115-32. <https://doi.org/10.1177/026119291804600304>.
- Fasano, A., T. Not, W. Wang, S. Uzzau, I. Berti, A. Tommasini, et S. E. Goldblum. 2000. « Zonulin, a Newly Discovered Modulator of Intestinal Permeability, and Its Expression in Coeliac Disease ».

- Lancet (London, England)* 355 (9214): 1518-19. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02169-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02169-3).
- Fenoll, José, Pilar Hellín, Paula Sabater, Pilar Flores, et Simón Navarro. 2012. « Trace Analysis of Sulfonylurea Herbicides in Water Samples by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry ». *Talanta* 101 (novembre): 273-82. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.09.026>.
- Fernández-Quintero, Monica L., Johannes Kraml, Guy Georges, et Klaus R. Liedl. 2019. « CDR-H3 Loop Ensemble in Solution - Conformational Selection upon Antibody Binding ». *MAbs* 11 (6): 1077-88. <https://doi.org/10.1080/19420862.2019.1618676>.
- Fey, Christina, Jana Betz, Corinna Rosenbaum, Dana Kralisch, Martin Vielreicher, Oliver Friedrich, Marco Metzger, et Daniela Zdzieblo. 2020. « Bacterial Nanocellulose as Novel Carrier for Intestinal Epithelial Cells in Drug Delivery Studies ». *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications* 109 (avril): 110613. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110613>.
- Fitchette, Anne-Catherine, Olivia Tran Dinh, Loïc Faye, et Muriel Bardor. 2007. « Plant Proteomics and Glycosylation ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 355: 317-42. <https://doi.org/10.1385/1-59745-227-0:317>.
- Flemming, Sven, Anny-Claude Luissint, Dennis H. M. Kusters, Arturo Raya-Sandino, Shuling Fan, Dennis W. Zhou, Mizuho Hasegawa, et al. 2020. « Desmocollin-2 Promotes Intestinal Mucosal Repair by Controlling Integrin-Dependent Cell Adhesion and Migration ». *Molecular Biology of the Cell* 31 (6): 407-18. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-12-0692>.
- Flicker, Sabine, Ines Zettl, et Sergei V. Tillib. 2020. « Nanobodies—Useful Tools for Allergy Treatment? » *Frontiers in Immunology* 11 (septembre): 576255. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.576255>.
- Frank, R., et G. J. Sirons. 1985. « Dissipation of Atrazine Residues from Soils ». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 34 (4): 541-48. <https://doi.org/10.1007/BF01609773>.
- Frontana-Uribe, Bernardo, Patricio Espinoza-Montero, Ruben Vasquez-Medrano, et Jorge Ibanez. 2013. « Efficient Anodic Degradation of Phenol Paired to Improved Cathodic Production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at BDD Electrodes ». *Journal of The Electrochemical Society* 160 (avril): G3171-77. <https://doi.org/10.1149/2.027307jes>.
- Fu, Zhaoying, et Jim Xiang. 2020. « Aptamer-Functionalized Nanoparticles in Targeted Delivery and Cancer Therapy ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (23): E9123. <https://doi.org/10.3390/ijms21239123>.
- Fujibe, Masato, Hideki Chiba, Takashi Kojima, Tamotsu Soma, Takuro Wada, Toshihiko Yamashita, et Norimasa Sawada. 2004. « Thr203 of Claudin-1, a Putative Phosphorylation Site for MAP Kinase, Is Required to Promote the Barrier Function of Tight Junctions ». *Experimental Cell Research* 295 (1): 36-47. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2003.12.014>.
- Fukuda, Shinji, Hidehiro Toh, Koji Hase, Kenshiro Oshima, Yumiko Nakanishi, Kazutoshi Yoshimura, Toru Tobe, et al. 2011. « Bifidobacteria Can Protect from Enteropathogenic Infection through Production of Acetate ». *Nature* 469 (7331): 543-47. <https://doi.org/10.1038/nature09646>.
- Fuqua, Brie K., Christopher D. Vulpe, et Gregory J. Anderson. 2012. « Intestinal Iron Absorption ». *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology: Organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)* 26 (2-3): 115-19. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2012.03.015>.
- Furness, J. B. 2000. « Types of Neurons in the Enteric Nervous System ». *Journal of the Autonomic Nervous System* 81 (1): 87-96. [https://doi.org/10.1016/S0165-1838\(00\)00127-2](https://doi.org/10.1016/S0165-1838(00)00127-2).

- Gaboriau-Routhiau, Valérie, et Nadine Cerf-Bensussan. 2016. « [Gut microbiota and development of the immune system] ». *Medicine Sciences: M/S* 32 (11): 961-67. <https://doi.org/10.1051/medsci/20163211011>.
- Gagné, Jean-François, Valerie Montminy, Patrick Belanger, Kim Journault, Genevieve Gaucher, et Chantal Guillemette. 2002. « Common Human UGT1A Polymorphisms and the Altered Metabolism of Irinotecan Active Metabolite 7-Ethyl-10-Hydroxycamptothecin (SN-38) ». *Molecular Pharmacology* 62 (3): 608-17. <https://doi.org/10.1124/mol.62.3.608>.
- Gagnon, Mélanie, Annina Zihler Berner, Noémie Chervet, Christophe Chassard, et Christophe Lacroix. 2013. « Comparison of the Caco-2, HT-29 and the Mucus-Secreting HT29-MTX Intestinal Cell Models to Investigate Salmonella Adhesion and Invasion ». *Journal of Microbiological Methods* 94 (3): 274-79. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.06.027>.
- Gajda, Angela M., et Judith Storch. 2015. « Enterocyte Fatty Acid-Binding Proteins (FABPs): Different Functions of Liver and Intestinal FABPs in the Intestine ». *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids* 93 (février): 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2014.10.001>.
- Galant, S. P. 1976. « Biological and Clinical Significance of the Gut as a Barrier to Penetration of Macromolecules. Practical Implications with Respect to Breast Feeding ». *Clinical Pediatrics* 15 (8): 731-34. <https://doi.org/10.1177/000992287601500809>.
- Gammon, Derek W., Charles N. Aldous, Wesley C. Carr, James R. Sanborn, et Keith F. Pfeifer. 2005. « A Risk Assessment of Atrazine Use in California: Human Health and Ecological Aspects ». *Pest Management Science* 61 (4): 331-55. <https://doi.org/10.1002/ps.1000>.
- García-Montaña, Julia, Nilbia Ruiz, Iván Muñoz, Xavier Domènech, José A. García-Hortal, Francesc Torrades, et José Peral. 2006. « Environmental Assessment of Different Photo-Fenton Approaches for Commercial Reactive Dye Removal ». *Journal of Hazardous Materials* 138 (2): 218-25. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.05.061>.
- Garrod, David, et Tomomi E. Kimura. 2008. « Hyper-Adhesion: A New Concept in Cell-Cell Adhesion ». *Biochemical Society Transactions* 36 (Pt 2): 195-201. <https://doi.org/10.1042/BST0360195>.
- Gashaw, Isabella, Peter Ellinghaus, Anette Sommer, et Khusru Asadullah. 2011. « What Makes a Good Drug Target? ». *Drug Discovery Today* 16 (23): 1037-43. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.09.007>.
- Gautam, Shailendra K., Sushil Kumar, Vi Dam, Dario Ghersi, Maneesh Jain, et Surinder K. Batra. 2020. « MUCIN-4 (MUC4) Is a Novel Tumor Antigen in Pancreatic Cancer Immunotherapy ». *Seminars in Immunology* 47 (février): 101391. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2020.101391>.
- Gayraud, Charlène, et Nicolas Borghi. 2018. « Activation de la voie  $\beta$ -caténine par mécanotransduction entre complexes d'adhérence ». *médecine/sciences* 34 (6-7): 506-8. <https://doi.org/10.1051/medsci/20183406004>.
- Gebauer, M., et A. Skerra. 2019. « Engineering of binding functions into proteins. ». *Current opinion in biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.05.007>.
- Gebauer, Michaela, et Arne Skerra. 2012. « Anticalins Small Engineered Binding Proteins Based on the Lipocalin Scaffold ». *Methods in Enzymology* 503: 157-88. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396962-0.00007-0>.
- Geens, Tinne, Laurence Roosens, Hugo Neels, et Adrian Covaci. 2009. « Assessment of Human Exposure to Bisphenol-A, Triclosan and Tetrabromobisphenol-A through Indoor Dust Intake in Belgium ». *Chemosphere* 76 (6): 755-60. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.05.024>.
- Genser, Laurent, Doriane Aguanno, Hédi A. Soula, Liping Dong, Laurence Trystram, Karen Assmann, Joe-Elie Salem, et al. 2018. « Increased Jejunal Permeability in Human Obesity Is Revealed by

- a Lipid Challenge and Is Linked to Inflammation and Type 2 Diabetes ». *The Journal of Pathology* 246 (2): 217-30. <https://doi.org/10.1002/path.5134>.
- Gérard, Philippe. 2016. « Gut Microbiota and Obesity ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 73 (1): 147-62. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2061-5>.
- Gerasimidis, Konstantinos, Katie Bryden, Xiufen Chen, Eleftheria Papachristou, Anais Verney, Marine Roig, Richard Hansen, Ben Nichols, Rodanthi Papadopoulou, et Alison Parrett. 2020. « The Impact of Food Additives, Artificial Sweeteners and Domestic Hygiene Products on the Human Gut Microbiome and Its Fibre Fermentation Capacity ». *European Journal of Nutrition* 59 (7): 3213-30. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-02161-8>.
- Ghestem, Jean-Philippe. s. d. « Fabrizio Botta (INERIS) et Benjamin Lopez (BRGM) », Valorisation des résultats des campagnes prospectives pour l'amélioration des connaissances sur les polluants organiques dans les milieux aquatiques. Rapport du BRGM.
- Ghishan, Fayez K., et Pawel R. Kiela. 2012. « Small Intestinal Ion Transport ». *Current Opinion in Gastroenterology* 28 (2): 130-34. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32834e7bc3>.
- Gil, Fátima N., Alina C. Gonçalves, Jörg D. Becker, et Cristina A. Viegas. 2018. « Comparative Analysis of Transcriptomic Responses to Sub-Lethal Levels of Six Environmentally Relevant Pesticides in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Ecotoxicology (London, England)* 27 (7): 871-89. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1929-1>.
- Giocanti-Auregan, A., R. Tadayoni, L. Ahn, J. T. Pena, et D. J. D'Amico. 2013. « Revue systématique de la littérature des modèles murins de rétinopathie diabétique ». *Journal Français d'Ophthalmologie* 36 (3): 268-76. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2012.08.001>.
- Gleeson, John P., Sinéad M. Ryan, et David J. Brayden. 2016. « Oral Delivery Strategies for Nutraceuticals: Delivery Vehicles and Absorption Enhancers ». *Trends in Food Science & Technology* 53 (juillet): 90-101. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.05.007>.
- Goericke-Pesch, S. 2017. « Long-Term Effects of GnRH Agonists on Fertility and Behaviour ». *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene* 52 Suppl 2 (avril): 336-47. <https://doi.org/10.1111/rda.12898>.
- Goldberg, D. M., et K. G. Wormsley. 1970. « The Interrelationships of Pancreatic Enzymes in Human Duodenal Aspirate ». *Gut* 11 (10): 859-66. <https://doi.org/10.1136/gut.11.10.859>.
- Gomes, Ana Sara, Helena Ramos, Joana Soares, et Lucília Saraiva. 2018. « P53 and Glucose Metabolism: An Orchestra to Be Directed in Cancer Therapy ». *Pharmacological Research* 131 (mai): 75-86. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.03.015>.
- Gonkowski, Slawomir, et Liliana Rytel. 2019. « Somatostatin as an Active Substance in the Mammalian Enteric Nervous System ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (18): E4461. <https://doi.org/10.3390/ijms20184461>.
- Gottardi, C. J., M. Arpin, A. S. Fanning, et D. Louvard. 1996. « The Junction-Associated Protein, Zonula Occludens-1, Localizes to the Nucleus before the Maturation and during the Remodeling of Cell-Cell Contacts ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (20): 10779-84. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.20.10779>.
- Götz, Thomas, et Peter Böger. 2004. « The Very-Long-Chain Fatty Acid Synthase Is Inhibited by Chloroacetamides ». *Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences* 59 (7-8): 549-53. <https://doi.org/10.1515/znc-2004-7-818>.
- Gowrikumar, Saiprasad, Rizwan Ahmad, Sriyayaprakash Babu Uppada, Mary K. Washington, Chanjuan Shi, Amar B. Singh, et Punita Dhawan. 2019. « Upregulated Claudin-1 Expression Promotes Colitis-Associated Cancer by Promoting  $\beta$ -Catenin Phosphorylation and Activation in Notch/p-

- AKT-Dependent Manner ». *Oncogene* 38 (26): 5321-37. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0795-5>.
- Grandcoin, Alexis, Stéphanie Piel, et Estelle Baurès. 2017. « AminoMethylPhosphonic Acid (AMPA) in Natural Waters: Its Sources, Behavior and Environmental Fate ». *Water Research* 117 (juin): 187-97. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.055>.
- Groeger, Sabine E., et Joerg Meyle. 2015. « Epithelial Barrier and Oral Bacterial Infection ». *Periodontology 2000* 69 (1): 46-67. <https://doi.org/10.1111/prd.12094>.
- Guan, Shan, Xuan Qin, Zhou Zhou, Qiang Zhang, et Yuan Huang. 2014. « Investigation of the Mechanisms of Improved Oral Bioavailability of Bergenin Using Bergenin-Phospholipid Complex ». *Drug Development and Industrial Pharmacy* 40 (2): 163-71. <https://doi.org/10.3109/03639045.2012.752500>.
- Guibal, Robin, Sophie Lissalde, Julie Leblanc, Karine Cleries, Adeline Charriau, Gaëlle Poulhier, Nicolas Mazzella, Jean-Pierre Rebillard, Yoann Brizard, et Gilles Guibaud. 2018. « Two Sampling Strategies for an Overview of Pesticide Contamination in an Agriculture-Extensive Headwater Stream ». *Environmental Science and Pollution Research International* 25 (15): 14280-93. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9883-7>.
- Guillot, Loïc, Nadia Nathan, Olivier Tabary, Guillaume Thouvenin, Philippe Le Rouzic, Harriet Corvol, Serge Amselem, et Annick Clement. 2013. « Alveolar Epithelial Cells: Master Regulators of Lung Homeostasis ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45 (11): 2568-73. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.08.009>.
- Guisbert, Eric, Daniel M. Czyz, Klaus Richter, Patrick D. McMullen, et Richard I. Morimoto. 2013. « Identification of a Tissue-Selective Heat Shock Response Regulatory Network ». *PLoS Genetics* 9 (4): e1003466. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003466>.
- Günther, Claudia, Helmut Neumann, Markus F. Neurath, et Christoph Becker. 2013. « Apoptosis, Necrosis and Necroptosis: Cell Death Regulation in the Intestinal Epithelium ». *Gut* 62 (7): 1062-71. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301364>.
- Günzel, Dorothee, et Michael Fromm. 2012. « Claudins and Other Tight Junction Proteins ». *Comprehensive Physiology* 2 (3): 1819-52. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110045>.
- Günzel, Dorothee, et Alan S. L. Yu. 2013. « Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability ». *Physiological Reviews* 93 (2): 525-69. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2012>.
- Haapamäki, M. M., J. Grönroos, H. Nurmi, K. Irjala, H. Peuravuori, et T. J. Nevalainen. 2006. « Value of Blood Tests Including Serum Group IIA Phospholipase A2 and Bactericidal/Permeability-Increasing Protein in Crohn's Disease ». *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 66 (7): 585-93. <https://doi.org/10.1080/00365510600898263>.
- Hageman, Joris H., Maria C. Heinz, Kai Kretschmar, Jelte van der Vaart, Hans Clevers, et Hugo J. G. Snippert. 2020. « Intestinal Regeneration: Regulation by the Microenvironment ». *Developmental Cell* 54 (4): 435-46. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.07.009>.
- Håkanson, R., D. Chen, Y. Tielemans, K. Andersson, B. Ryberg, F. Sundler, et H. Mattsson. 1994. « ECL Cells: Biology and Pathobiology ». *Digestion* 55 Suppl 3: 38-45. <https://doi.org/10.1159/000201200>.
- Halbleib, Jennifer M., et W. James Nelson. 2006. « Cadherins in Development: Cell Adhesion, Sorting, and Tissue Morphogenesis ». *Genes & Development* 20 (23): 3199-3214. <https://doi.org/10.1101/gad.1486806>.

- Hall, I. H., A. R. Murthy, et S. D. Wyrick. 1986. « Hypolipidemic Activity of 6-Substituted 6,7-Dihydro-5H-Dibenz[c,e]Azepine and the Effects of 6,7-Dihydro-5H-Dibenz[c,e]Azepine on Lipid Metabolism of Rodents ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 75 (6): 622-26. <https://doi.org/10.1002/jps.2600750622>.
- Hamid, Abid, Nissar Ahmad Wani, Satyavati Rana, Kim Vaiphei, Akhtar Mahmood, et Jyotdeep Kaur. 2007. « Down-Regulation of Reduced Folate Carrier May Result in Folate Malabsorption across Intestinal Brush Border Membrane during Experimental Alcoholism ». *The FEBS Journal* 274 (24): 6317-28. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06150.x>.
- Hamidi, Hellyeh, Johanna Lilja, et Johanna Ivaska. 2017. « Using xCELLigence RTCA Instrument to Measure Cell Adhesion ». *Bio-protocol* 7 (24): e2646. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2646>.
- Hammad, Hamida, et Bart N. Lambrecht. 2015. « Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2 Immunity ». *Immunity* 43 (1): 29-40. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.07.007>.
- Hamuro, Yoshitomo, Stephen J. Coales, Kathleen S. Molnar, Steven J. Tuske, et Jeffrey A. Morrow. 2008. « Specificity of Immobilized Porcine Pepsin in H/D Exchange Compatible Conditions ». *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM* 22 (7): 1041-46. <https://doi.org/10.1002/rcm.3467>.
- Handelsman, Jo. 2004. « Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 68 (4): 669-85. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.4.669-685.2004>.
- Handen, Benjamin L., Raun D. Melmed, Robin L. Hansen, Michael G. Aman, David L. Burnham, Jon B. Bruss, et Christopher J. McDougle. 2009. « A Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Oral Human Immunoglobulin for Gastrointestinal Dysfunction in Children with Autistic Disorder ». *Journal of Autism and Developmental Disorders* 39 (5): 796-805. <https://doi.org/10.1007/s10803-008-0687-y>.
- Harboe, M., G. Ulvund, L. Vien, M. Fung, et T. E. Mollnes. 2004. « The Quantitative Role of Alternative Pathway Amplification in Classical Pathway Induced Terminal Complement Activation ». *Clinical and Experimental Immunology* 138 (3): 439-46. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02627.x>.
- Hart, A, H E Barber, et T N Calvey. 1975. « Bioavailability and dissolution of different formulations of oxytetracycline preparations. » *British Journal of Clinical Pharmacology* 2 (3): 277-80.
- Hayes, Tyrone B., Lloyd L. Anderson, Val R. Beasley, Shane R. de Solla, Taisen Iguchi, Holly Ingraham, Patrick Kestemont, et al. 2011. « Demasculinization and Feminization of Male Gonads by Atrazine: Consistent Effects across Vertebrate Classes ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 127 (1-2): 64-73. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.03.015>.
- He, Hongzhi, Jing Yu, Guikui Chen, Wenyang Li, Jinbo He, et Huashou Li. 2012. « Acute Toxicity of Butachlor and Atrazine to Freshwater Green Alga Scenedesmus Obliquus and Cladoceran Daphnia Carinata ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80 (juin): 91-96. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.02.009>.
- Hermanns, Maria Iris, Ronald E. Unger, Kai Kehe, Kirsten Peters, et Charles James Kirkpatrick. 2004. « Lung Epithelial Cell Lines in Coculture with Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells: Development of an Alveolo-Capillary Barrier in Vitro ». *Laboratory Investigation* 84 (6): 736-52. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700081>.
- Hervé, Jean-Claude, et Mickaël Derangeon. 2013. « Gap-Junction-Mediated Cell-to-Cell Communication ». *Cell and Tissue Research* 352 (1): 21-31. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1485-6>.

- Hetz, Claudio, Kezhong Zhang, et Randal J. Kaufman. 2020. « Mechanisms, Regulation and Functions of the Unfolded Protein Response ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 21 (8): 421-38. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0250-z>.
- Hidalgo, I. J., T. J. Raub, et R. T. Borchardt. 1989. « Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability ». *Gastroenterology* 96 (3): 736-49.
- Ho, Josephine, Alissa C. Nicolucci, Heidi Virtanen, Alana Schick, Jon Meddings, Raylene A. Reimer, et Carol Huang. 2019. « Effect of Prebiotic on Microbiota, Intestinal Permeability, and Glycemic Control in Children With Type 1 Diabetes ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 104 (10): 4427-40. <https://doi.org/10.1210/jc.2019-00481>.
- Hoebler, C., G. Lecannu, C. Belleville, M.-F. Devaux, Y. Popineau, et J.-L. Barry. 2002. « Development of an in Vitro System Simulating Bucco-Gastric Digestion to Assess the Physical and Chemical Changes of Food ». *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 53 (5): 389-402. <https://doi.org/10.1080/0963748021000044732>.
- Hoffmann, Toni, Lukas Kurt Josef Stadler, Michael Busby, Qifeng Song, Anthony T. Buxton, Simon D. Wagner, Jason J. Davis, et Paul Ko Ferrigno. 2010. « Structure-function studies of an engineered scaffold protein derived from stefin A. I: Development of the SQM variant ». *Protein Engineering, Design and Selection* 23 (5): 403-13. <https://doi.org/10.1093/protein/gzq012>.
- Hollander, Daniel, et Jonathan D. Kaunitz. 2020. « The “Leaky Gut”: Tight Junctions but Loose Associations? ». *Digestive Diseases and Sciences* 65 (5): 1277-87. <https://doi.org/10.1007/s10620-019-05777-2>.
- Holliger, Philipp, et Peter J. Hudson. 2005. « Engineered Antibody Fragments and the Rise of Single Domains ». *Nature Biotechnology* 23 (9): 1126-36. <https://doi.org/10.1038/nbt1142>.
- Holmes, Jennifer L., Christina M. Van Itallie, Julia E. Rasmussen, et James M. Anderson. 2006. « Claudin Profiling in the Mouse during Postnatal Intestinal Development and along the Gastrointestinal Tract Reveals Complex Expression Patterns ». *Gene Expression Patterns: GEP* 6 (6): 581-88. <https://doi.org/10.1016/j.modgep.2005.12.001>.
- Hooper, Lora V., Melissa H. Wong, Anders Thelin, Lennart Hansson, Per G. Falk, et Jeffrey I. Gordon. 2001. « Molecular Analysis of Commensal Host-Microbial Relationships in the Intestine ». *Science* 291 (5505): 881-84. <https://doi.org/10.1126/science.291.5505.881>.
- Hosey, Chelsea M., Fabio Broccatelli, et Leslie Z. Benet. 2014. « Predicting When Biliary Excretion of Parent Drug Is a Major Route of Elimination in Humans ». *The AAPS Journal* 16 (5): 1085-96. <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9636-1>.
- Hou, Jianghui, Antonio S. Gomes, David L. Paul, et Daniel A. Goodenough. 2006. « Study of Claudin Function by RNA Interference ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (47): 36117-23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608853200>.
- Hou, Jianghui, Aparna Renigunta, Martin Konrad, Antonio S. Gomes, Eveline E. Schneeberger, David L. Paul, Siegfried Waldegger, et Daniel A. Goodenough. 2008. « Claudin-16 and Claudin-19 Interact and Form a Cation-Selective Tight Junction Complex ». *The Journal of Clinical Investigation* 118 (2): 619-28. <https://doi.org/10.1172/JCI33970>.
- Hou, Jianghui, Aparna Renigunta, Jing Yang, et Siegfried Waldegger. 2010. « Claudin-4 Forms Paracellular Chloride Channel in the Kidney and Requires Claudin-8 for Tight Junction Localization ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (42): 18010-15. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009399107>.

- Hou, Shengnan, Na Zheng, Lin Tang, Xiaofeng Ji, Yunyang Li, et Xiuyi Hua. 2019. « Pollution Characteristics, Sources, and Health Risk Assessment of Human Exposure to Cu, Zn, Cd and Pb Pollution in Urban Street Dust across China between 2009 and 2018 ». *Environment International* 128 (juillet): 430-37. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.046>.
- Hu, Xu, Tao Wang, et Feng Jin. 2016. « Alzheimer's Disease and Gut Microbiota ». *Science China. Life Sciences* 59 (10): 1006-23. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-5083-9>.
- Hubatsch, Ina, Eva G. E. Ragnarsson, et Per Artursson. 2007. « Determination of Drug Permeability and Prediction of Drug Absorption in Caco-2 Monolayers ». *Nature Protocols* 2 (9): 2111-19. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.303>.
- Huet, Simon, Harmony Gorre, Anaëlle Perrocheau, Justine Picot, et Mathieu Cinier. 2015. « Use of the Nanofitin Alternative Scaffold as a GFP-Ready Fusion Tag ». *PloS One* 10 (11): e0142304. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142304>.
- Hug, Laura A., Brett J. Baker, Karthik Anantharaman, Christopher T. Brown, Alexander J. Probst, Cindy J. Castelle, Cristina N. Butterfield, et al. 2016. « A New View of the Tree of Life ». *Nature Microbiology* 1 (5): 16048. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.48>.
- Hunte, Carola, Emanuela Screpanti, Miro Venturi, Abraham Rimón, Etana Padan, et Hartmut Michel. 2005. « Structure of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter and Insights into Mechanism of Action and Regulation by PH ». *Nature* 435 (7046): 1197-1202. <https://doi.org/10.1038/nature03692>.
- Ibrahim, Mariam, et Lucila Garcia-Contreras. 2013. « Mechanisms of Absorption and Elimination of Drugs Administered by Inhalation ». *Therapeutic Delivery* 4 (8): 1027-45. <https://doi.org/10.4155/tde.13.67>.
- Inai, T., J. Kobayashi, et Y. Shibata. 1999. « Claudin-1 Contributes to the Epithelial Barrier Function in MDCK Cells ». *European Journal of Cell Biology* 78 (12): 849-55. [https://doi.org/10.1016/S0171-9335\(99\)80086-7](https://doi.org/10.1016/S0171-9335(99)80086-7).
- Ingrand, J. 2012. « La spectrométrie de masse et ses principales applications en biologie médicale ». *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 27 (2): 47-53. <https://doi.org/10.1016/j.immbio.2012.01.008>.
- Isering, P., et B. Forbush. 1997. « Ion and Bumetanide Binding by the Na-K-Cl Cotransporter. Importance of Transmembrane Domains ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (39): 24556-62. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.39.24556>.
- Ito, Shinya, et Amy Lee. 2003. « Drug Excretion into Breast Milk--Overview ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 55 (5): 617-27. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(03\)00034-6](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(03)00034-6).
- Itoh, M., M. Furuse, K. Morita, K. Kubota, M. Saitou, et S. Tsukita. 1999. « Direct Binding of Three Tight Junction-Associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH Termini of Claudins ». *The Journal of Cell Biology* 147 (6): 1351-63. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.6.1351>.
- Ivanov, Andrei I. 2008. « Pharmacological Inhibition of Endocytic Pathways: Is It Specific Enough to Be Useful? » In *Exocytosis and Endocytosis*, édité par Andrei I. Ivanov, 15-33. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-178-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-178-9_2).
- Jancova, Petra, Pavel Anzenbacher, et Eva Anzenbacherova. 2010. « Phase II Drug Metabolizing Enzymes ». *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* 154 (2): 103-16. <https://doi.org/10.5507/bp.2010.017>.
- Jarchi, Samaneh, Farangis Ataei, et Saman Hosseinkhani. 2018. « Mutation of Conserved Residues K329 and R330 on the Surface of Firefly Luciferase: Effect on Proteolytic Degradation ». *International Journal of Biological Macromolecules* 115 (août): 324-30. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.050>.

- Jasion, Victoria S, et Bruce P Burnett. 2015. « Survival and Digestibility of Orally-Administered Immunoglobulin Preparations Containing IgG through the Gastrointestinal Tract in Humans ». *Nutrition Journal* 14 (1): 22. <https://doi.org/10.1186/s12937-015-0010-7>.
- Jin, Yuanxiang, Rujia Chen, Linggang Wang, Jingwen Liu, Yuefeng Yang, Cheng Zhou, Weiping Liu, et Zhengwei Fu. 2011. « Effects of Metolachlor on Transcription of Thyroid System-Related Genes in Juvenile and Adult Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*) ». *General and Comparative Endocrinology* 170 (3): 487-93. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.11.001>.
- Jin-Clark, Ying, Troy D. Anderson, et Kun Yan Zhu. 2008. « Effect of Alachlor and Metolachlor on Toxicity of Chlorpyrifos and Major Detoxification Enzymes in the Aquatic Midge, *Chironomus Tentans* (Diptera: Chironomidae) ». *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 54 (4): 645-52. <https://doi.org/10.1007/s00244-007-9067-4>.
- Johdi, Nor Adzimah, et Nur Fazilah Sukor. 2020. « Colorectal Cancer Immunotherapy: Options and Strategies ». *Frontiers in Immunology* 11: 1624. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01624>.
- Jolly, C., et R. I. Morimoto. 2000. « Role of the Heat Shock Response and Molecular Chaperones in Oncogenesis and Cell Death ». *Journal of the National Cancer Institute* 92 (19): 1564-72. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.19.1564>.
- Jones, H. E., G. K. Blundell, R. R. Tidwell, J. E. Hall, S. J. Farr, et R. J. Richards. 1993. « The Accumulation of Pentamidine and the Toxic Effects of the Drug, Its Selected Analogues and Metabolites on Isolated Alveolar Cells ». *Toxicology* 80 (1): 1-12. [https://doi.org/10.1016/0300-483x\(93\)90072-z](https://doi.org/10.1016/0300-483x(93)90072-z).
- Jovov, Biljana, Christina M. Van Itallie, Nicholas J. Shaheen, Johnny L. Carson, Todd M. Gambling, James M. Anderson, et Roy C. Orlando. 2007. « Claudin-18: A Dominant Tight Junction Protein in Barrett's Esophagus and Likely Contributor to Its Acid Resistance ». *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 293 (6): G1106-1113. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00158.2007>.
- Jury, William A., Arthur M. Winer, William F. Spencer, et Dennis D. Focht. 1987. « Transport and Transformations of Organic Chemicals in the Soil-Air-Water Ecosystem ». In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: Continuation of Residue Reviews*, édité par George W. Ware, 119-64. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. New York, NY: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8719-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8719-0_5).
- Kakogiannos, Nikolaos, Laura Ferrari, Costanza Giampietro, Anna Agata Scalise, Claudio Maderna, Micol Ravà, Andrea Taddei, et al. 2020. « JAM-A Acts via C/EBP- $\alpha$  to Promote Claudin-5 Expression and Enhance Endothelial Barrier Function ». *Circulation Research* 127 (8): 1056-73. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.316742>.
- Kalichuk, Valentina, Ghislaine Béhar, Axelle Renodon-Cornière, Georgi Danovski, Gonzalo Obal, Jacques Barbet, Barbara Mouratou, et Frédéric Pecorari. 2016. « The Archaeal "7 KDa DNA-Binding" Proteins: Extended Characterization of an Old Gifted Family ». *Scientific Reports* 6 (novembre): 37274. <https://doi.org/10.1038/srep37274>.
- Kalichuk, Valentina, Stanimir Kambarev, Ghislaine Béhar, Benjamin Chalopin, Axelle Renodon-Cornière, Barbara Mouratou, et Frédéric Pecorari. 2020. « Affitins: Ribosome Display for Selection of Aho7c-Based Affinity Proteins ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 2070: 19-41. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9853-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9853-1_2).
- Kalichuk, Valentina, Axelle Renodon-Cornière, Ghislaine Béhar, Federico Carrión, Gonzalo Obal, Mike Maillason, Barbara Mouratou, Véronique Prétat, et Frédéric Pecorari. 2018a. « A Novel, Smaller Scaffold for Affitins: Showcase with Binders Specific for EpCAM ». *Biotechnology and Bioengineering* 115 (2): 290-99. <https://doi.org/10.1002/bit.26463>.

- Kämpfer, Angela A. M., Patricia Urbán, Sabrina Gioria, Nilesh Kanase, Vicki Stone, et Agnieszka Kinsner-Ovaskainen. 2017. « Development of an in Vitro Co-Culture Model to Mimic the Human Intestine in Healthy and Diseased State ». *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 45 (Pt 1): 31-43. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.08.011>.
- Kanda, T., Y. Nakatomi, H. Ishikawa, M. Hitomi, Y. Matsubara, T. Ono, et T. Muto. 1992. « Intestinal Fatty Acid-Binding Protein as a Sensitive Marker of Intestinal Ischemia ». *Digestive Diseases and Sciences* 37 (9): 1362-67. <https://doi.org/10.1007/BF01296004>.
- Kang, Dae-Wook, James B. Adams, Devon M. Coleman, Elena L. Pollard, Juan Maldonado, Sharon McDonough-Means, J. Gregory Caporaso, et Rosa Krajmalnik-Brown. 2019. « Long-Term Benefit of Microbiota Transfer Therapy on Autism Symptoms and Gut Microbiota ». *Scientific Reports* 9 (1): 5821. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42183-0>.
- Kapingidza, A. Brenda, Krzysztof Kowal, et Maksymilian Chruszcz. 2020. « Antigen-Antibody Complexes ». *Sub-Cellular Biochemistry* 94: 465-97. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-41769-7\\_19](https://doi.org/10.1007/978-3-030-41769-7_19).
- Karbach, U., K. Ewe, et H. Bodenstern. 1983. « Alpha 1-Antitrypsin, a Reliable Endogenous Marker for Intestinal Protein Loss and Its Application in Patients with Crohn's Disease ». *Gut* 24 (8): 718-23. <https://doi.org/10.1136/gut.24.8.718>.
- Kartal, Alma, Janne Marvola, Jenni Matheka, Marikki Peltoniemi, et Mia Sivén. 2010. « Computational Prediction of Local Drug Effect on Carcinogenic Acetaldehyde in the Mouth Based on in Vitro/in Vivo Results of Freely Soluble L-Cysteine ». *Drug Development and Industrial Pharmacy* 36 (6): 715-23. <https://doi.org/10.3109/03639040903456519>.
- Kasendra, Magdalena, Raymond Luc, Jianyi Yin, Dimitris V Manatakis, Gauri Kulkarni, Carolina Lucchesi, Josiah Sliz, et al. 2020. « Duodenum Intestine-Chip for preclinical drug assessment in a human relevant model ». *eLife* 9: e50135. <https://doi.org/10.7554/eLife.50135>.
- Kataoka, Makoto, Yoshie Masaoka, Yukako Yamazaki, Toshiyasu Sakane, Hitoshi Sezaki, et Shinji Yamashita. 2003. « In Vitro System to Evaluate Oral Absorption of Poorly Water-Soluble Drugs: Simultaneous Analysis on Dissolution and Permeation of Drugs ». *Pharmaceutical Research* 20 (10): 1674-80. <https://doi.org/10.1023/a:1026107906191>.
- Kawe, Martin, Patrik Forrer, Patrick Amstutz, et Andreas Plückthun. 2006. « Isolation of Intracellular Proteinase Inhibitors Derived from Designed Ankyrin Repeat Proteins by Genetic Screening ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (52): 40252-63. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602506200>.
- Kemler, R. 1992. « Classical Cadherins ». *Seminars in Cell Biology* 3 (3): 149-55. [https://doi.org/10.1016/s1043-4682\(10\)80011-x](https://doi.org/10.1016/s1043-4682(10)80011-x).
- Keseru, M., P. Budai, L. Várnagy, R. Szabó, E. Juhász, G. Babinszky, et A. Pongrácz. 2004. « Teratogenicity Study of Some Pesticides in Chicken Embryos ». *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 69 (4): 803-6.
- Keshavarzian, Ali, Phillip Engen, Salvatore Bonvegna, et Roberto Cilia. 2020. « Chapter 11 - The Gut Microbiome in Parkinson's Disease: A Culprit or a Bystander? » In *Progress in Brain Research*, édité par Anders Björklund et M. Angela Cenci, 252:357-450. Recent Advances in Parkinson's Disease. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2020.01.004>.
- Kim, Hyun Jung, Ho Jin Sung, Yul Min Lee, Sun Il Choi, Yun-Hee Kim, Kyun Heo, et In-Hoo Kim. 2020. « Therapeutic Application of Drug-Conjugated HER2 Oligobody (HER2-DOLigobody) ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (9): E3286. <https://doi.org/10.3390/ijms21093286>.

- Kim, Stephen S., Rebecca Penkala, et Parwiz Abrahami. 2007. « A Perfusion Bioreactor for Intestinal Tissue Engineering ». *The Journal of Surgical Research* 142 (2): 327-31. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2007.03.039>.
- Kintzing, James R., Maria V. Filsinger Interrante, et Jennifer R. Cochran. 2016. « Emerging Strategies for Developing Next-Generation Protein Therapeutics for Cancer Treatment ». *Trends in Pharmacological Sciences* 37 (12): 993-1008. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.10.005>.
- Kita, Katarzyna, et Christian Dittrich. 2011. « Drug Delivery Vehicles with Improved Encapsulation Efficiency: Taking Advantage of Specific Drug-Carrier Interactions ». *Expert Opinion on Drug Delivery* 8 (3): 329-42. <https://doi.org/10.1517/17425247.2011.553216>.
- Kitous, O., N. Abdi, H. Lounici, H. Grib, N. Drouiche, E.H. Benyoussef, et N. Mameri. 2016. « Modeling of the adsorption of metribuzin pesticide onto electro-activated granular carbon ». *Desalination and Water Treatment* 57 (4): 1865-73. <https://doi.org/10.1080/19443994.2014.977961>.
- Knauf, Felix, Narae Ko, Zhirong Jiang, William G. Robertson, Christina M. Van Itallie, James M. Anderson, et Peter S. Aronson. 2011. « Net Intestinal Transport of Oxalate Reflects Passive Absorption and SLC26A6-Mediated Secretion ». *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 22 (12): 2247-55. <https://doi.org/10.1681/ASN.2011040433>.
- Kobayashi, Nobuhide, Daisuke Takahashi, Shunsuke Takano, Shunsuke Kimura, et Koji Hase. 2019. « The Roles of Peyer's Patches and Microfold Cells in the Gut Immune System: Relevance to Autoimmune Diseases ». *Frontiers in Immunology* 10: 2345. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02345>.
- Koide, A., C. W. Bailey, X. Huang, et S. Koide. 1998. « The Fibronectin Type III Domain as a Scaffold for Novel Binding Proteins ». *Journal of Molecular Biology* 284 (4): 1141-51. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2238>.
- Koide, Akiko, John Wojcik, Ryan N. Gilbreth, Robert J. Hoey, et Shohei Koide. 2012. « Teaching an Old Scaffold New Tricks: Monobodies Constructed Using Alternative Surfaces of the FN3 Scaffold ». *Journal of Molecular Biology* 415 (2): 393-405. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.12.019>.
- Kong, Fanbin, et R. Paul Singh. 2010. « A Human Gastric Simulator (HGS) to Study Food Digestion in Human Stomach ». *Journal of Food Science* 75 (9): E627-635. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01856.x>.
- Kontermann, Roland E. 2011. « Strategies for Extended Serum Half-Life of Protein Therapeutics ». *Current Opinion in Biotechnology* 22 (6): 868-76. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.06.012>.
- Koop, I. 1990. « Role of Bile Acids in the Control of Pancreatic Secretion and CCK Release ». *European Journal of Clinical Investigation* 20 Suppl 1 (octobre): S51-57. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.1990.tb01778.x>.
- Koppel, Nitzan, Vayu Maini Rekdal, et Emily P. Balskus. 2017. « Chemical Transformation of Xenobiotics by the Human Gut Microbiota ». *Science (New York, N.Y.)* 356 (6344): eaag2770. <https://doi.org/10.1126/science.aag2770>.
- Kottke, Margaret D., Emmanuella Delva, et Andrew P. Kowalczyk. 2006. « The Desmosome: Cell Science Lessons from Human Diseases ». *Journal of Cell Science* 119 (Pt 5): 797-806. <https://doi.org/10.1242/jcs.02888>.
- Koyama, K., K. Koyama, et K. Goto. 1997. « Cardiovascular Effects of a Herbicide Containing Glufosinate and a Surfactant: In Vitro and in Vivo Analyses in Rats ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 145 (2): 409-14. <https://doi.org/10.1006/taap.1997.8196>.

- Krawczyk, Natalia, Franziska Meier-Stiegen, Malgorzata Banys, Hans Neubauer, Eugen Ruckhaeberle, et Tanja Fehm. 2014. « Expression of Stem Cell and Epithelial-Mesenchymal Transition Markers in Circulating Tumor Cells of Breast Cancer Patients ». *BioMed Research International* 2014 (mai): e415721. <https://doi.org/10.1155/2014/415721>.
- Krehenbrink, Martin, Mohamed Chami, Ingrid Guilvout, Pedro M. Alzari, Frédéric Pécorari, et Anthony P. Pugsley. 2008. « Artificial Binding Proteins (Affitins) as Probes for Conformational Changes in Secretin PulD ». *Journal of Molecular Biology* 383 (5): 1058-68. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.09.016>.
- Kremer, Robert J., et Nathan E. Means. 2009. « Glyphosate and Glyphosate-Resistant Crop Interactions with Rhizosphere Microorganisms ». *European Journal of Agronomy, Glyphosate Interactions with Physiology, Nutrition, and Diseases of Plants: Threat to Agricultural Sustainability?*, 31 (3): 153-61. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2009.06.004>.
- Krug, Susanne M., Dorothee Günzel, Marcel P. Conrad, Rita Rosenthal, Anja Fromm, Salah Amasheh, Jörg D. Schulzke, et Michael Fromm. 2012. « Claudin-17 Forms Tight Junction Channels with Distinct Anion Selectivity ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 69 (16): 2765-78. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-0949-x>.
- Kruger, E., L. Somasundaram, J. Coats, et R. Kanwar. 1993. « Persistence and degradation of [14C]atrazine and [14C]deisopropylatrazine as affected by soil depth and moisture conditions ». <https://doi.org/10.1002/ETC.5620121102>.
- Krutz, Larry J., Terry J. Gentry, Scott A. Senseman, Ian L. Pepper, et Dennis P. Tierney. 2006. « Mineralisation of Atrazine, Metolachlor and Their Respective Metabolites in Vegetated Filter Strip and Cultivated Soil ». *Pest Management Science* 62 (6): 505-14. <https://doi.org/10.1002/ps.1193>.
- Kruziki, Max A., Sumit Bhatnagar, Daniel R. Woldring, Vandon T. Duong, et Benjamin J. Hackel. 2015. « A 45-amino acid scaffold mined from the Protein Data Bank for high affinity ligand engineering ». *Chemistry & biology* 22 (7): 946-56. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.06.012>.
- Kupnik, Kaja, Mateja Primožič, Vanja Kokol, et Maja Leitgeb. 2020. « Nanocellulose in Drug Delivery and Antimicrobially Active Materials ». *Polymers* 12 (12): E2825. <https://doi.org/10.3390/polym12122825>.
- Kushwaha, Neelottama, et C. S. Sharma. 2020. « The Chemistry of Triazine Isomers: Structures, Reactions, Synthesis and Applications ». *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 20 (20): 2104-22. <https://doi.org/10.2174/1389557520666200729160720>.
- Laddha, Ankit P., S. Murugesan, et Yogesh A. Kulkarni. 2020. « In-Vivo and in-Silico Toxicity Studies of Daidzein: An Isoflavone from Soy ». *Drug and Chemical Toxicology*, octobre, 1-9. <https://doi.org/10.1080/01480545.2020.1833906>.
- Lammers, Karen M., Ruliang Lu, Julie Brownley, Bao Lu, Craig Gerard, Karen Thomas, Prasad Rallabhandi, et al. 2008. « Gliadin Induces an Increase in Intestinal Permeability and Zonulin Release by Binding to the Chemokine Receptor CXCR3 ». *Gastroenterology* 135 (1): 194-204.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.023>.
- Lamson, Nicholas G., Adrian Berger, Katherine C. Fein, et Kathryn A. Whitehead. 2020. « Anionic Nanoparticles Enable the Oral Delivery of Proteins by Enhancing Intestinal Permeability ». *Nature Biomedical Engineering* 4 (1): 84-96. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0465-5>.
- Landrigan, Philip J., John J. Stegeman, Lora E. Fleming, Denis Allemand, Donald M. Anderson, Lorraine C. Backer, Françoise Brucker-Davis, et al. s. d. « Human Health and Ocean Pollution ». *Annals of Global Health* 86 (1): 151. <https://doi.org/10.5334/aogh.2831>.

- Lapicque, F., P. Netter, C. Monot, B. Bannwarth, M. S. Maknassi, et R. J. Royer. 1986. « [Determination of protein binding of drugs using equilibrium dialysis. Influence of volume displacement caused by osmotic pressure] ». *Journal De Pharmacologie* 17 (3): 295-300.
- Larabi, Anaïs, Nicolas Barnich, et Hang Thi Thu Nguyen. 2020. « New Insights into the Interplay between Autophagy, Gut Microbiota and Inflammatory Responses in IBD ». *Autophagy* 16 (1): 38-51. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1635384>.
- Larsen, Nadja, Finn K. Vogensen, Frans W. J. van den Berg, Dennis Sandris Nielsen, Anne Sofie Andreasen, Bente K. Pedersen, Waleed Abu Al-Soud, Søren J. Sørensen, Lars H. Hansen, et Mogens Jakobsen. 2010. « Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults ». *PLOS ONE* 5 (2): e9085. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009085>.
- Laville, Nathalie, Patrick Balaguer, François Brion, Nathalie Hinfray, Claude Casellas, Jean-Marc Porcher, et Sélim Aït-Aïssa. 2006. « Modulation of Aromatase Activity and mRNA by Various Selected Pesticides in the Human Choriocarcinoma JEG-3 Cell Line ». *Toxicology* 228 (1): 98-108. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.08.021>.
- LeBlanc, Jean Guy, Christian Milani, Graciela Savoy de Giori, Fernando Sesma, Douwe van Sinderen, et Marco Ventura. 2013. « Bacteria as Vitamin Suppliers to Their Host: A Gut Microbiota Perspective ». *Current Opinion in Biotechnology* 24 (2): 160-68. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.08.005>.
- Lebrun, Lorène J., Kaatje Lenaerts, Dorien Kiers, Jean-Paul Pais de Barros, Naig Le Guern, Jiri Plesnik, Charles Thomas, et al. 2017. « Enteroendocrine L Cells Sense LPS after Gut Barrier Injury to Enhance GLP-1 Secretion ». *Cell Reports* 21 (5): 1160-68. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.008>.
- Lee, Y. H., B. A. Perry, S. Labruno, H. S. Lee, W. Stern, L. M. Falzone, et P. J. Sinko. 1999. « Impact of Regional Intestinal PH Modulation on Absorption of Peptide Drugs: Oral Absorption Studies of Salmon Calcitonin in Beagle Dogs ». *Pharmaceutical Research* 16 (8): 1233-39. <https://doi.org/10.1023/a:1014849630520>.
- Lee, Young Ju, Seung Ryul Han, Nam Yeon Kim, Soo-Han Lee, Jin-Sook Jeong, et Seong-Wook Lee. 2012. « An RNA Aptamer That Binds Carcinoembryonic Antigen Inhibits Hepatic Metastasis of Colon Cancer Cells in Mice ». *Gastroenterology* 143 (1): 155-165.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.03.039>.
- Lentle, R. G., et C. de Loubens. 2015. « A Review of Mixing and Propulsion of Chyme in the Small Intestine: Fresh Insights from New Methods ». *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 185 (4): 369-87. <https://doi.org/10.1007/s00360-015-0889-5>.
- Leonard, Fransisca, Hussain Ali, Eva-Maria Collnot, Bart J. Crielaard, Twan Lammers, Gert Storm, et Claus-Michael Lehr. 2012. « Screening of Budesonide Nanoformulations for Treatment of Inflammatory Bowel Disease in an Inflamed 3D Cell-Culture Model ». *ALTEX* 29 (3): 275-85. <https://doi.org/10.14573/altex.2012.3.275>.
- Leszczynska, Katarzyna B., Iosifina P. Foskolou, Aswin G. Abraham, Selvakumar Anbalagan, Céline Tellier, Syed Haider, Paul N. Span, Eric E. O'Neill, Francesca M. Buffa, et Ester M. Hammond. 2015. « Hypoxia-Induced P53 Modulates Both Apoptosis and Radiosensitivity via AKT ». *The Journal of Clinical Investigation* 125 (6): 2385-98. <https://doi.org/10.1172/JCI80402>.
- Li, Ban-Ruo, Jia Wu, Hua-Shan Li, Zhi-Hui Jiang, Xiu-Min Zhou, Cai-Hua Xu, Ning Ding, Juan-Min Zha, et Wei-Qi He. 2018. « In Vitro and In Vivo Approaches to Determine Intestinal Epithelial Cell Permeability ». *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, n° 140 (octobre): 57032. <https://doi.org/10.3791/57032>.

- Li, Na, Dandan Wang, Zhigang Sui, Xiaoyi Qi, Liyun Ji, Xiuli Wang, et Ling Yang. 2013. « Development of an Improved Three-Dimensional in Vitro Intestinal Mucosa Model for Drug Absorption Evaluation ». *Tissue Engineering. Part C, Methods* 19 (9): 708-19. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2012.0463>.
- Li, Xingnan, Lincoln Nadauld, Akifumi Ootani, David C. Corney, Reetesh K. Pai, Olivier Gevaert, Michael A. Cantrell, et al. 2014. « Oncogenic Transformation of Diverse Gastrointestinal Tissues in Primary Organoid Culture ». *Nature Medicine* 20 (7): 769-77. <https://doi.org/10.1038/nm.3585>.
- Li, Xingnan, Akifumi Ootani, et Calvin Kuo. 2016. « An Air-Liquid Interface Culture System for 3D Organoid Culture of Diverse Primary Gastrointestinal Tissues ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1422: 33-40. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3603-8\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3603-8_4).
- Lin, Alice V. 2015. « Direct ELISA ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1318: 61-67. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5_6).
- Lindenbaum, J., D. G. Rund, V. P. Butler, D. Tse-Eng, et J. R. Saha. 1981. « Inactivation of Digoxin by the Gut Flora: Reversal by Antibiotic Therapy ». *The New England Journal of Medicine* 305 (14): 789-94. <https://doi.org/10.1056/NEJM198110013051403>.
- Lissner, Donata, Michael Schumann, Arvind Batra, Lea-Isabel Kredel, Anja A. Kühn, Ulrike Erben, Claudia May, Jörg-Dieter Schulzke, et Britta Siegmund. 2015. « Monocyte and M1 Macrophage-Induced Barrier Defect Contributes to Chronic Intestinal Inflammation in IBD ». *Inflammatory Bowel Diseases* 21 (6): 1297-1305. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000384>.
- Liu, Julia J., Karen Wong, Aducio L. Thiesen, Stephanie J. Mah, Levinus A. Dieleman, Brian Claggett, John R. Saltzman, et Richard N. Fedorak. 2011. « Increased Epithelial Gaps in the Small Intestines of Patients with Inflammatory Bowel Disease: Density Matters ». *Gastrointestinal Endoscopy* 73 (6): 1174-80. <https://doi.org/10.1016/j.gie.2011.01.018>.
- Liu, Yu-Xin, Jianli Wang, Jianfen Guo, Jingjing Wu, Howard B. Lieberman, et Yuxin Yin. 2008. « DUSP1 Is Controlled by P53 during the Cellular Response to Oxidative Stress ». *Molecular Cancer Research: MCR* 6 (4): 624-33. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-2019>.
- Löfblom, J., J. Feldwisch, V. Tolmachev, J. Carlsson, S. Ståhl, et F. Y. Frejd. 2010. « Affibody Molecules: Engineered Proteins for Therapeutic, Diagnostic and Biotechnological Applications ». *FEBS Letters* 584 (12): 2670-80. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.014>.
- Lollo, Giovanna, Ana Gonzalez-Paredes, Marcos Garcia-Fuentes, Pilar Calvo, Dolores Torres, et Maria Jose Alonso. 2017. « Polyarginine Nanocapsules as a Potential Oral Peptide Delivery Carrier ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 106 (2): 611-18. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.09.029>.
- Lopetuso, Loris R., Saleem Chowdhry, et Theresa T. Pizarro. 2013. « Opposing Functions of Classic and Novel IL-1 Family Members in Gut Health and Disease ». *Frontiers in Immunology* 4: 181. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00181>.
- Love, Michael I., Wolfgang Huber, et Simon Anders. 2014. « Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2 ». *Genome Biology* 15 (12): 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
- Lowes, Simon, Iain S. Haslam, Britt-Marie Fihn, Constanze Hilgendorf, Johan E. Karlsson, Nicholas L. Simmons, et Anna-Lena Ungell. 2010. « The Effects of Pregnenolone 16 $\alpha$ -Carbonitrile Dosing on Digoxin Pharmacokinetics and Intestinal Absorption in the Rat ». *Pharmaceutics* 2 (1): 61-77. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics2010061>.

- Lozoya-Agullo, Isabel, Francisca Araújo, Isabel González-Álvarez, Matilde Merino-Sanjuán, Marta González-Álvarez, Marival Bermejo, et Bruno Sarmento. 2017. « Usefulness of Caco-2/HT29-MTX and Caco-2/HT29-MTX/Raji B Coculture Models To Predict Intestinal and Colonic Permeability Compared to Caco-2 Monoculture ». *Molecular Pharmaceutics* 14 (4): 1264-70. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b01165>.
- Lucas, Jane S. A., Stella A. Cochrane, John O. Warner, et Jonathan O' B. Hourihane. 2008. « The Effect of Digestion and PH on the Allergenicity of Kiwifruit Proteins ». *Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 19 (5): 392-98. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2007.00678.x>.
- Lutgendorff, Femke, Louis M. A. Akkermans, et Johan D. Söderholm. 2008. « The Role of Microbiota and Probiotics in Stress-Induced Gastro-Intestinal Damage ». *Current Molecular Medicine* 8 (4): 282-98. <https://doi.org/10.2174/156652408784533779>.
- Lv, Qian, Qiang He, Yue Wu, Xi Chen, Yali Ning, et Yan Chen. 2019. « Investigating the Bioaccessibility and Bioavailability of Cadmium in a Cooked Rice Food Matrix by Using an 11-Day Rapid Caco-2/HT-29 Co-Culture Cell Model Combined with an In Vitro Digestion Model ». *Biological Trace Element Research* 190 (2): 336-48. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1554-0>.
- Lynch, Susan V., et Oluf Pedersen. 2016. « The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease ». Review-article. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1600266>. Massachusetts Medical Society. World. 14 décembre 2016. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1600266>.
- Ma, Jonathan, Bruce K. Rubin, et Judith A. Voynow. 2018. « Mucins, Mucus, and Goblet Cells ». *Chest* 154 (1): 169-76. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.11.008>.
- Ma, L., et H. M. Selim. 1996. « Atrazine Retention and Transport in Soils ». *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 145: 129-73. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2354-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2354-2_2).
- Macdonald, Joanna, Delphine Denoyer, Justin Henri, Adelaide Jamieson, Ingrid J. G. Burvenich, Normand Pouliot, et Sarah Shigdar. 2020. « Bifunctional Aptamer-Doxorubicin Conjugate Crosses the Blood-Brain Barrier and Selectively Delivers Its Payload to EpCAM-Positive Tumor Cells ». *Nucleic Acid Therapeutics* 30 (2): 117-28. <https://doi.org/10.1089/nat.2019.0807>.
- Machado, Manuela D., et Eduardo V. Soares. 2021. « Exposure of the Alga *Pseudokirchneriella Subcapitata* to Environmentally Relevant Concentrations of the Herbicide Metolachlor: Impact on the Redox Homeostasis ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 207 (janvier): 111264. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111264>.
- Madara, J. L., et J. R. Pappenheimer. 1987. « Structural Basis for Physiological Regulation of Paracellular Pathways in Intestinal Epithelia ». *The Journal of Membrane Biology* 100 (2): 149-64. <https://doi.org/10.1007/BF02209147>.
- Madden, Luran R., Theresa V. Nguyen, Salvador Garcia-Mojica, Vishal Shah, Alex V. Le, Andrea Peier, Richard Visconti, et al. 2018. « Bioprinted 3D Primary Human Intestinal Tissues Model Aspects of Native Physiology and ADME/Tox Functions ». *IScience* 2 (avril): 156-67. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.03.015>.
- Mai, Huong, Patrice Gonzalez, Patrick Pardon, Nathalie Tapie, Hélène Budzinski, Jérôme Cachot, et Bénédicte Morin. 2014. « Comparative Responses of Sperm Cells and Embryos of Pacific Oyster (*Crassostrea Gigas*) to Exposure to Metolachlor and Its Degradation Products ». *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 147 (février): 48-56. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.024>.
- Mai, Huong, Bénédicte Morin, Patrick Pardon, Patrice Gonzalez, Hélène Budzinski, et Jérôme Cachot. 2013. « Environmental Concentrations of Irgarol, Diuron and S-Metolachlor Induce Deleterious

- Effects on Gametes and Embryos of the Pacific Oyster, *Crassostrea Gigas* ». *Marine Environmental Research* 89 (août): 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.04.003>.
- Mainville, I., Y. Arcand, et E. R. Farnworth. 2005. « A Dynamic Model That Simulates the Human Upper Gastrointestinal Tract for the Study of Probiotics ». *International Journal of Food Microbiology* 99 (3): 287-96. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.020>.
- Malago, Joshua J., Jos F.J.G. Koninkx, et Jaap E. van Dijk. 2002. « The heat shock response and cytoprotection of the intestinal epithelium ». *Cell Stress & Chaperones* 7 (2): 191-99.
- Malik, Asrar B., Joseph J. Lynch, et Jeffrey A. Cooper. 1989. « Endothelial Barrier Function ». *Journal of Investigative Dermatology* 93 (2): S62-67. <https://doi.org/10.1038/jid.1989.11>.
- Marsh, P. D., et Egija Zaura. 2017. « Dental Biofilm: Ecological Interactions in Health and Disease ». *Journal of Clinical Periodontology* 44 Suppl 18 (mars): S12-22. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12679>.
- Mason, Robert J. 2006. « Biology of Alveolar Type II Cells ». *Respirology* 11 (s1): S12-15. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2006.00800.x>.
- Mathias, Francielle Tatiane, Renata Marino Romano, Hanan Kaled Sleiman, Claudio Alvarenga de Oliveira, et Marco Aurelio Romano. 2012. « Herbicide Metolachlor Causes Changes in Reproductive Endocrinology of Male Wistar Rats ». *ISRN Toxicology* 2012: 130846. <https://doi.org/10.5402/2012/130846>.
- Mathias, Neil R., et Munir A. Hussain. 2010. « Non-Invasive Systemic Drug Delivery: Developability Considerations for Alternate Routes of Administration ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 99 (1): 1-20. <https://doi.org/10.1002/jps.21793>.
- Maubon, Nathalie, Marc Le Vee, Lina Fossati, Mathilde Audry, Eric Le Ferrec, Sebastien Bolze, et Olivier Fardel. 2007. « Analysis of Drug Transporter Expression in Human Intestinal Caco-2 Cells by Real-Time PCR ». *Fundamental & Clinical Pharmacology* 21 (6): 659-63. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2007.00550.x>.
- McCarthy, K. M., S. A. Francis, J. M. McCormack, J. Lai, R. A. Rogers, I. B. Skare, R. D. Lynch, et E. E. Schneeberger. 2000. « Inducible Expression of Claudin-1-Myc but Not Occludin-VSV-G Results in Aberrant Tight Junction Strand Formation in MDCK Cells ». *Journal of Cell Science* 113 Pt 19 (octobre): 3387-98.
- McCullum, Elizabeth O., Berea A. R. Williams, Jinglei Zhang, et John C. Chaput. 2010. « Random Mutagenesis by Error-Prone PCR ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 634: 103-9. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-652-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-652-8_7).
- Megha, K. B., et P. V. Mohanan. 2021. « Role of Immunoglobulin and Antibodies in Disease Management ». *International Journal of Biological Macromolecules* 169 (février): 28-38. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.073>.
- Merbel, Nico C. van de. 2019. « Protein Quantification by LC-MS: A Decade of Progress through the Pages of Bioanalysis ». *Bioanalysis* 11 (7): 629-44. <https://doi.org/10.4155/bio-2019-0032>.
- Micsonai, András, Frank Wien, Linda Kernya, Young-Ho Lee, Yuji Goto, Matthieu Réfrégiers, et József Kardos. 2015. « Accurate Secondary Structure Prediction and Fold Recognition for Circular Dichroism Spectroscopy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (24): E3095-3103. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500851112>.
- Milatz, Susanne, Susanne M. Krug, Rita Rosenthal, Dorothee Günzel, Dominik Müller, Jörg-Dieter Schulzke, Salah Amasheh, et Michael Fromm. 2010. « Claudin-3 Acts as a Sealing Component of the Tight Junction for Ions of Either Charge and Uncharged Solutes ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1798 (11): 2048-57. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.07.014>.

- Milla, Sylvain, Sophie Depiereux, et Patrick Kestemont. 2011. « The Effects of Estrogenic and Androgenic Endocrine Disruptors on the Immune System of Fish: A Review ». *Ecotoxicology* 20 (2): 305-19. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0588-7>.
- Miller, D. D., B. R. Schriker, R. R. Rasmussen, et D. Van Campen. 1981. « An in Vitro Method for Estimation of Iron Availability from Meals ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 34 (10): 2248-56. <https://doi.org/10.1093/ajcn/34.10.2248>.
- Miranda, Frederico F., Elodie Brient-Litzler, Nora Zidane, Frédéric Pecorari, et Hugues Bedouelle. 2011. « Reagentless Fluorescent Biosensors from Artificial Families of Antigen Binding Proteins ». *Biosensors & Bioelectronics* 26 (10): 4184-90. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.04.030>.
- Miyakawa, Maki, Takumi Konno, Takayuki Kohno, Shin Kikuchi, Hiroki Tanaka, et Takashi Kojima. 2020. « Increase in Epithelial Permeability and Cell Metabolism by High Mobility Group Box 1, Inflammatory Cytokines and TPEN in Caco-2 Cells as a Novel Model of Inflammatory Bowel Disease ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (22): E8434. <https://doi.org/10.3390/ijms21228434>.
- Miyazawa, Taiki, Gregor C. Burdeos, Mayuko Itaya, Kiyotaka Nakagawa, et Teruo Miyazawa. 2019. « Vitamin E: Regulatory Redox Interactions ». *IUBMB Life* 71 (4): 430-41. <https://doi.org/10.1002/iub.2008>.
- Miyoshi, Hiroyuki, Rieko Ajima, Christine T. Luo, Terry P. Yamaguchi, et Thaddeus S. Stappenbeck. 2012. « Wnt5a Potentiates TGF- $\beta$  Signaling to Promote Colonic Crypt Regeneration After Tissue Injury ». *Science* 338 (6103): 108-13. <https://doi.org/10.1126/science.1223821>.
- Mo, Yiqun, Rong Wan, Lingfang Feng, Sufan Chien, David J. Tollerud, et Qunwei Zhang. 2012. « Combination Effects of Cigarette Smoke Extract and Ambient Ultrafine Particles on Endothelial Cells ». *Toxicology in Vitro* 26 (2): 295-303. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.12.001>.
- Modesti, Mauro. 2011. « Fluorescent Labeling of Proteins ». In *Single Molecule Analysis: Methods and Protocols*, édité par Erwin J. G. Peterman et Gijs J. L. Wuite, 101-20. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-282-3\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-282-3_6).
- Moon, Yuseok, Hyun Yang, et Yung Bu Kim. 2007. « Up-Regulation of Early Growth Response Gene 1 (EGR-1) via ERK1/2 Signals Attenuates Sulindac Sulfide-Mediated Cytotoxicity in the Human Intestinal Epithelial Cells ». *Toxicology and Applied Pharmacology, Charting the Future: Building the Scientific Foundation for Mixtures Joint Toxicity and Risk Assessment*, 223 (2): 155-63. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.04.018>.
- Moore, Simon J., James T. MacDonald, Sarah Wienecke, Alka Ishwarbhai, Argyro Tsipa, Rochelle Aw, Nicolas Kylilis, et al. 2018. « Rapid Acquisition and Model-Based Analysis of Cell-Free Transcription–Translation Reactions from Nonmodel Bacteria ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (19): E4340-49. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715806115>.
- Moyes, Siobhan M, John F Morris, et Katharine E Carr. 2010. « Macrophages increase microparticle uptake by enterocyte-like Caco-2 cell monolayers ». *Journal of Anatomy* 217 (6): 740-54. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2010.01304.x>.
- Mukherjee, Arkadeep, et M. Sudhakar Reddy. 2020. « Metatranscriptomics: An Approach for Retrieving Novel Eukaryotic Genes from Polluted and Related Environments ». *3 Biotech* 10 (2): 71. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2057-1>.
- Müller, C. A., I. B. Autenrieth, et A. Peschel. 2005. « Innate Defenses of the Intestinal Epithelial Barrier ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 62 (12): 1297-1307. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5034-2>.

- Munoz, Ana, William C. Koskinen, Lucía Cox, et Michael J. Sadowsky. 2011. « Biodegradation and Mineralization of Metolachlor and Alachlor by *Candida Xestobii* ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (2): 619-27. <https://doi.org/10.1021/jf103508w>.
- Naeem, Muhammad, Uzma Azeem Awan, Fazli Subhan, Jiafu Cao, Shwe Phyu Hlaing, Juho Lee, Eunok Im, Yunjin Jung, et Jin-Wook Yoo. 2020. « Advances in Colon-Targeted Nano-Drug Delivery Systems: Challenges and Solutions ». *Archives of Pharmacal Research* 43 (1): 153-69. <https://doi.org/10.1007/s12272-020-01219-0>.
- Nakamura, Tetsuya. 2019. « Recent progress in organoid culture to model intestinal epithelial barrier functions ». *International Immunology* 31 (1): 13-21. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxy065>.
- Naruhashi, Kazumasa, Yuko Kurahashi, Yukari Fujita, Eri Kawakita, Yuna Yamasaki, Kana Hattori, Asako Nishimura, et Nobuhito Shibata. 2011. « Comparison of the Expression and Function of ATP Binding Cassette Transporters in Caco-2 and T84 Cells on Stimulation by Selected Endogenous Compounds and Xenobiotics ». *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 26 (2): 145-53. <https://doi.org/10.2133/dmpk.dmpk-10-rg-075>.
- Nava, Amy R., Natalia Mauricio, Angel J. Sanca, et Delfina C. Domínguez. 2020. « Evidence of Calcium Signaling and Modulation of the LmrS Multidrug Resistant Efflux Pump Activity by Ca<sup>2+</sup> + Ions in *S. Aureus* ». *Frontiers in Microbiology* 11: 573388. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.573388>.
- Negróni, Anna, Eleonora Colantoni, Salvatore Cucchiara, et Laura Stronati. 2020. « Necroptosis in Intestinal Inflammation and Cancer: New Concepts and Therapeutic Perspectives ». *Biomolecules* 10 (10): E1431. <https://doi.org/10.3390/biom10101431>.
- Ngigi, Anastasiah, Ulrike Dörfler, Hagen Scherb, Zachary Getenga, Hamadi Boga, et Reiner Schroll. 2011. « Effect of Fluctuating Soil Humidity on in Situ Bioavailability and Degradation of Atrazine ». *Chemosphere* 84 (4): 369-75. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.068>.
- Nguyen, Thanh Xuan, Lin Huang, Mario Gauthier, Guang Yang, et Qun Wang. 2016. « Recent advances in liposome surface modification for oral drug delivery ». *Nanomedicine* 11 (9): 1169-85. <https://doi.org/10.2217/nnm.16.9>.
- Nicholson, Jeremy K., Elaine Holmes, et Ian D. Wilson. 2005. « Gut Microorganisms, Mammalian Metabolism and Personalized Health Care ». *Nature Reviews. Microbiology* 3 (5): 431-38. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1152>.
- Nicholson, Jeremy K., et Ian D. Wilson. 2003. « Opinion: Understanding “global” Systems Biology: Metabonomics and the Continuum of Metabolism ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 2 (8): 668-76. <https://doi.org/10.1038/nrd1157>.
- Nishida, Atsushi, Ryo Inoue, Osamu Inatomi, Shigeki Bamba, Yuji Naito, et Akira Andoh. 2018. « Gut Microbiota in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease ». *Clinical Journal of Gastroenterology* 11 (1): 1-10. <https://doi.org/10.1007/s12328-017-0813-5>.
- Niu, Xiaoyu, Inge A. M. de Graaf, et Geny M. M. Groothuis. 2013. « Evaluation of the Intestinal Toxicity and Transport of Xenobiotics Utilizing Precision-Cut Slices ». *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems* 43 (1): 73-83. <https://doi.org/10.3109/00498254.2012.729870>.
- Nödler, Karsten, Tobias Licha, et Dimitra Voutsas. 2013. « Twenty Years Later – Atrazine Concentrations in Selected Coastal Waters of the Mediterranean and the Baltic Sea ». *Marine Pollution Bulletin* 70 (1): 112-18. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.02.018>.

- Noel, Gaelle, Nicholas W. Baetz, Janet F. Staab, Mark Donowitz, Olga Kovbasnjuk, Marcela F. Pasetti, et Nicholas C. Zachos. 2017. « A Primary Human Macrophage-Enteroid Co-Culture Model to Investigate Mucosal Gut Physiology and Host-Pathogen Interactions ». *Scientific Reports* 7 (mars): 45270. <https://doi.org/10.1038/srep45270>.
- Nollet, Friedel, Patrick Kools, et Frans van Roy. 2000. « Phylogenetic Analysis of the Cadherin Superfamily Allows Identification of Six Major Subfamilies besides Several Solitary Members<sup>11</sup>Edited by M. Yaniv ». *Journal of Molecular Biology* 299 (3): 551-72. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3777>.
- Nord, K., E. Gunneriusson, J. Ringdahl, S. Ståhl, M. Uhlén, et P. A. Nygren. 1997. « Binding Proteins Selected from Combinatorial Libraries of an Alpha-Helical Bacterial Receptor Domain ». *Nature Biotechnology* 15 (8): 772-77. <https://doi.org/10.1038/nbt0897-772>.
- Nunbhakdi-Craig, Viyada, Thomas Machleidt, Egon Ogris, Dennis Bellotto, Charles L. White, et Estelle Sontag. 2002. « Protein phosphatase 2A associates with and regulates atypical PKC and the epithelial tight junction complex ». *The Journal of Cell Biology* 158 (5): 967-78. <https://doi.org/10.1083/jcb.200206114>.
- Oakes, D. J., et J. K. Pollack. 1999. « Effects of a Herbicide Formulation, Tordon 75D, and Its Individual Components on the Oxidative Functions of Mitochondria ». *Toxicology* 136 (1): 41-52. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(99\)00055-4](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(99)00055-4).
- Ochoa-Acuña, Hugo, Jane Frankenberger, Leighanne Hahn, et Cristina Carbajo. 2009. « Drinking-Water Herbicide Exposure in Indiana and Prevalence of Small-for-Gestational-Age and Preterm Delivery ». *Environmental Health Perspectives* 117 (10): 1619-24. <https://doi.org/10.1289/ehp.0900784>.
- Odenwald, Matthew A., et Jerrold R. Turner. 2013. « Intestinal permeability defects: Is it time to treat? » *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 11 (9): 1075-83. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2013.07.001>.
- O'Doherty, Charles, Joanne Keenan, Karina Horgan, Richard Murphy, Finbarr O'Sullivan, et Martin Clynes. 2019. « Copper-Induced Non-Monotonic Dose Response in Caco-2 Cells ». *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 55 (4): 221-25. <https://doi.org/10.1007/s11626-019-00333-8>.
- Okumura, Ryu, et Kiyoshi Takeda. 2017. « Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis ». *Experimental & Molecular Medicine* 49 (5): e338. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.20>.
- Oliveira, Sabrina Elisa, Pauliane Melo Costa, Sara Batista Nascimento, Whocely Victor Castro, Rosy Iara Maciel de Azambuja Ribeiro, Hélio Batista Santos, et Ralph Gruppi Thomé. 2018. « Atrazine Promotes Immunomodulation by Melanomacrophage Centre Alterations in Spleen and Vascular Disorders in Gills from *Oreochromis Niloticus* ». *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 202 (septembre): 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.06.018>.
- Oller, I., S. Malato, et J. A. Sánchez-Pérez. 2011. « Combination of Advanced Oxidation Processes and Biological Treatments for Wastewater Decontamination--a Review ». *The Science of the Total Environment* 409 (20): 4141-66. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.08.061>.
- Oswald, Isabelle P. 2006. « Role of Intestinal Epithelial Cells in the Innate Immune Defence of the Pig Intestine ». *Veterinary Research* 37 (3): 359-68. <https://doi.org/10.1051/vetres:2006006>.
- Otani, Tetsuhisa, Thanh Phuong Nguyen, Shinsaku Tokuda, Kei Sugihara, Taichi Sugawara, Kyoko Furuse, Takashi Miura, Klaus Ebnet, et Mikio Furuse. 2019. « Claudins and JAM-A coordinately

- regulate tight junction formation and epithelial polarity ». *The Journal of Cell Biology* 218 (10): 3372-96. <https://doi.org/10.1083/jcb.201812157>.
- Pacheco, Sabino, Ghislaine Béhar, Mike Maillason, Barbara Mouratou, et Frédéric Pecorari. 2014. « Affinity Transfer to the Archaeal Extremophilic Sac7d Protein by Insertion of a CDR ». *Protein Engineering, Design & Selection: PEDS* 27 (10): 431-38. <https://doi.org/10.1093/protein/gzu042>.
- Pade, V., et S. Stavchansky. 1997. « Estimation of the Relative Contribution of the Transcellular and Paracellular Pathway to the Transport of Passively Absorbed Drugs in the Caco-2 Cell Culture Model ». *Pharmaceutical Research* 14 (9): 1210-15. <https://doi.org/10.1023/a:1012111008617>.
- Paone, Paola, et Patrice D. Cani. 2020. « Mucus Barrier, Mucins and Gut Microbiota: The Expected Slimy Partners? ». *Gut* 69 (12): 2232-43. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322260>.
- Park, S. J., B. H. Lui, et J. R. Cochran. 2017. « 4.14 Rational and Combinatorial Methods to Create Designer Protein Interfaces☆ ». In *Comprehensive Biomaterials II*, édité par Paul Ducheyne, 221-47. Oxford: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.10152-3>.
- Patel, N., B. Forbes, S. Eskola, et J. Murray. 2006. « Use of Simulated Intestinal Fluids with Caco-2 Cells and Rat Ileum ». *Drug Development and Industrial Pharmacy* 32 (2): 151-61. <https://doi.org/10.1080/03639040500465991>.
- Paul, Bishal, Satya Sundar Bhattacharya, et Nayanmoni Gogoi. 2021. « Primacy of Ecological Engineering Tools for Combating Eutrophication: An Ecohydrological Assessment Pathway ». *The Science of the Total Environment* 762 (mars): 143171. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143171>.
- Pecorari, Frédéric, et Pedro Alzari. 2008. Ob-Fold Used as Scaffold for Engineering New Specific Binders, issued 12 juin 2008. <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?jsessionid=C61B13D792F1CA6A142ECB5B4D973B95.wapp2nB?docId=WO2008068637&tab=PCTDESCRIPTION>.
- Peijnenburg, Willie J. G. M., et Jaap Struijs. 2006. « Occurrence of Phthalate Esters in the Environment of the Netherlands ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63 (2): 204-15. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.07.023>.
- Peraza-Vega, Ricardo I., América N. Castañeda-Sortibrán, Mahara Valverde, Emilio Rojas, et Rosario Rodríguez-Arnaiz. 2017. « Assessing Genotoxicity of Diuron on *Drosophila Melanogaster* by the Wing-Spot Test and the Wing Imaginal Disk Comet Assay ». *Toxicology and Industrial Health* 33 (5): 443-53. <https://doi.org/10.1177/0748233716670536>.
- Pereira, Natasha A., Kah Fai Chan, Pao Chun Lin, et Zhiwei Song. 2018. « The “Less-Is-More” in Therapeutic Antibodies: Afucosylated Anti-Cancer Antibodies with Enhanced Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity ». *MAbs* 10 (5): 693-711. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1466767>.
- Pereira, Susana P., Maria A. S. Fernandes, João D. Martins, Maria S. Santos, António J. M. Moreno, Joaquim A. F. Vicente, Romeu A. Videira, et Amália S. Jurado. 2009. « Toxicity Assessment of the Herbicide Metolachlor Comparative Effects on Bacterial and Mitochondrial Model Systems ». *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 23 (8): 1585-90. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.06.032>.
- Pessayre, D., et J. P. Benhamou. 1979. « [Reactive metabolites of xenobiotics : their role in the hepatotoxicity of drugs] ». *Comptes Rendus Des Seances De La Societe De Biologie Et De Ses Filiales* 173 (2): 458-68.

- Pfaffl, Michael W. 2001. « A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR ». *Nucleic Acids Research* 29 (9): e45.
- Pierre, Brennal, Vandan Shah, Jenny Xiao, et Jin Ryouon Kim. 2015. « Construction of a Random Circular Permutation Library Using an Engineered Transposon ». *Analytical Biochemistry* 474 (avril): 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.12.011>.
- Pithadia, Anand B., et Sunita Jain. 2011. « Treatment of Inflammatory Bowel Disease (IBD) ». *Pharmacological Reports: PR* 63 (3): 629-42. [https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(11\)70575-8](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(11)70575-8).
- Pocock, Kyal, Ludivine Delon, Vaskor Bala, Shasha Rao, Craig Priest, Clive Prestidge, et Benjamin Thierry. 2017. « Intestine-on-a-Chip Microfluidic Model for Efficient in Vitro Screening of Oral Chemotherapeutic Uptake ». *ACS Biomaterials Science & Engineering* 3 (6): 951-59. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.7b00023>.
- Polard, T., S. Jean, L. Gauthier, C. Laplanche, G. Merlina, J. M. Sánchez-Pérez, et E. Pinelli. 2011. « Mutagenic Impact on Fish of Runoff Events in Agricultural Areas in South-West France ». *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 101 (1): 126-34. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.09.014>.
- Ponce de León-Rodríguez, Maria Del Carmen, Jean-Pierre Guyot, et Caroline Laurent-Babot. 2019. « Intestinal in Vitro Cell Culture Models and Their Potential to Study the Effect of Food Components on Intestinal Inflammation ». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59 (22): 3648-66. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1506734>.
- Ponec, Maria. 2002. « Skin Constructs for Replacement of Skin Tissues for in Vitro Testing ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 54 Suppl 1 (novembre): S19-30. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(02\)00112-6](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(02)00112-6).
- Pratt, Jennifer, Neetu Venkatraman, Amanda Brinker, Yongling Xiao, Jim Blasberg, David C. Thompson, et Maureen Bourner. 2012. « Use of Zinc Finger Nuclease Technology to Knock out Efflux Transporters in C2BBel Cells ». *Current Protocols in Toxicology* Chapter 23 (mai): Unit 23.2. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx2302s52>.
- Prüss-Üstün, Annette, Jennyfer Wolf, Carlos Corvalán, World Health Organization, Robert Bos, et Dr Maria Neira. 2016. *Preventing Disease Through Healthy Environments: A Global Assessment of the Burden of Disease from Environmental Risks*. World Health Organization.
- Puissant, C., P. Abraham, S. Durand, A. Humeau-Heurtier, S. Faure, P. Rousseau, et G. Mahé. 2014. « La fonction endothéliale : rôle, méthodes d'évaluation et limites ». *Journal des Maladies Vasculaires* 39 (1): 47-56. <https://doi.org/10.1016/j.jmv.2013.11.004>.
- Pusch, Jacqueline, Miriam Votteler, Stella Göhler, Jasmin Engl, Martina Hampel, Heike Walles, et Katja Schenke-Layland. 2011. « The Physiological Performance of a Three-Dimensional Model That Mimics the Microenvironment of the Small Intestine ». *Biomaterials* 32 (30): 7469-78. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.06.035>.
- Qiang, Zhimin, Chao Liu, Bingzhi Dong, et Yalei Zhang. 2010. « Degradation Mechanism of Alachlor during Direct Ozonation and O(3)/H(2)O(2) Advanced Oxidation Process ». *Chemosphere* 78 (5): 517-26. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.11.037>.
- Rainey, Nathan E., Ana Saric, Alexandre Leberre, Etienne Dewailly, Christian Slomianny, Guillaume Vial, Harold I. Zeligler, et Patrice X. Petit. 2017. « Synergistic Cellular Effects Including Mitochondrial Destabilization, Autophagy and Apoptosis Following Low-Level Exposure to a Mixture of Lipophilic Persistent Organic Pollutants ». *Scientific Reports* 7 (1): 4728. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04654-0>.

- Raleigh, David R., Amanda M. Marchiando, Yong Zhang, Le Shen, Hiroyuki Sasaki, Yingmin Wang, Manyuan Long, et Jerrold R. Turner. 2010. « Tight Junction–associated MARVEL Proteins MarvelD3, Tricellulin, and Occludin Have Distinct but Overlapping Functions ». *Molecular Biology of the Cell* 21 (7): 1200-1213. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-08-0734>.
- Rani, Vibha, Gagan Deep, Rakesh K. Singh, Komaraiah Palle, et Umesh C. S. Yadav. 2016. « Oxidative Stress and Metabolic Disorders: Pathogenesis and Therapeutic Strategies ». *Life Sciences* 148 (mars): 183-93. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.002>.
- Reboul, Emmanuelle. 2019. « Vitamin E Intestinal Absorption: Regulation of Membrane Transport across the Enterocyte ». *IUBMB Life* 71 (4): 416-23. <https://doi.org/10.1002/iub.1955>.
- Rehmani, Sahrish, et James E. Dixon. 2018. « Oral Delivery of Anti-Diabetes Therapeutics Using Cell Penetrating and Transcytosing Peptide Strategies ». *Peptides* 100 (février): 24-35. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.12.014>.
- Reis, J. M., B. Sinkó, et C. H. R. Serra. 2010. « Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) - Is It Better than Caco-2 for Human Passive Permeability Prediction? » *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 10 (11): 1071-76. <https://doi.org/10.2174/1389557511009011071>.
- Revest, Jean-Michel, Francesco Di Blasi, Pierre Kitchener, Françoise Rougé-Pont, Aline Desmedt, Marc Turiault, François Tronche, et Pier Vincenzo Piazza. 2005. « The MAPK Pathway and Egr-1 Mediate Stress-Related Behavioral Effects of Glucocorticoids ». *Nature Neuroscience* 8 (5): 664-72. <https://doi.org/10.1038/nn1441>.
- Review of *Modeling Development and Disease with Organoids*, par Hans Clevers. 2016. *Cell* 165 (7): 1586-97. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.082>.
- Rhee, Sang H., Charalabos Pothoulakis, et Emeran A. Mayer. 2009. « Principles and Clinical Implications of the Brain-Gut-Enteric Microbiota Axis ». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 6 (5): 306-14. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2009.35>.
- Rios-Doria, Jonathan, Kathleen C. Day, Rainer Kuefer, Michael G. Rashid, Arul M. Chinnaiyan, Mark A. Rubin, et Mark L. Day. 2003. « The Role of Calpain in the Proteolytic Cleavage of E-Cadherin in Prostate and Mammary Epithelial Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (2): 1372-79. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208772200>.
- Rocha, R. A., D. Vélez, et V. Devesa. 2012. « In Vitro Evaluation of Intestinal Fluoride Absorption Using Different Cell Models ». *Toxicology Letters* 210 (3): 311-17. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.02.015>.
- Rosa, F. W., A. L. Wilk, et F. O. Kelsey. 1986. « Teratogen Update: Vitamin A Congeners ». *Teratology* 33 (3): 355-64. <https://doi.org/10.1002/tera.1420330315>.
- Rossi, Giuliana, Andrea Manfrin, et Matthias P. Lutolf. 2018. « Progress and Potential in Organoid Research ». *Nature Reviews. Genetics* 19 (11): 671-87. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0051-9>.
- Roy, F. van, et G. Berx. 2008. « The Cell-Cell Adhesion Molecule E-Cadherin ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 65 (23): 3756-88. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8281-1>.
- Rubio, Carlos A. 2015. « Increased Production of Lysozyme Associated with Bacterial Proliferation in Barrett’s Esophagitis, Chronic Gastritis, Gluten-Induced Atrophic Duodenitis (Celiac Disease), Lymphocytic Colitis, Collagenous Colitis, Ulcerative Colitis and Crohn’s Colitis ». *Anticancer Research* 35 (12): 6365-72.
- Russo, Daniel P., Judy Strickland, Agnes L. Karmaus, Wenyi Wang, Sunil Shende, Thomas Hartung, Lauren M. Aleksunes, et Hao Zhu. 2019. « Nonanimal Models for Acute Toxicity Evaluations:

- Applying Data-Driven Profiling and Read-Across ». *Environmental Health Perspectives* 127 (4): 47001. <https://doi.org/10.1289/EHP3614>.
- Ryan, K. M., M. K. Ernst, N. R. Rice, et K. H. Vousden. 2000. « Role of NF-KappaB in P53-Mediated Programmed Cell Death ». *Nature* 404 (6780): 892-97. <https://doi.org/10.1038/35009130>.
- Ryu, Bokyeong, C.-Yoon Kim, Hanseul Oh, Ukjin Kim, Jin Kim, Cho-Rok Jung, Byoung-Hee Lee, et al. 2018. « Development of an Alternative Zebrafish Model for Drug-Induced Intestinal Toxicity ». *Journal of Applied Toxicology: JAT* 38 (2): 259-73. <https://doi.org/10.1002/jat.3520>.
- Sabatino, Alice, Giuseppe Regolisti, Carmela Cosola, Loreto Gesualdo, et Enrico Fiaccadori. 2017. « Intestinal Microbiota in Type 2 Diabetes and Chronic Kidney Disease ». *Current Diabetes Reports* 17 (3): 16. <https://doi.org/10.1007/s11892-017-0841-z>.
- Saeedi, Bejan J., Daniel J. Kao, David A. Kitzenberg, Evgenia Dobrinskikh, Kayla D. Schwisow, Joanne C. Masterson, Agnieszka A. Kendrick, et al. 2015. « HIF-dependent regulation of claudin-1 is central to intestinal epithelial tight junction integrity ». *Molecular Biology of the Cell* 26 (12): 2252-62. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-07-1194>.
- Salonen, Anne, Leo Lahti, Jarkko Salojärvi, Grietje Holtrop, Katri Korpela, Sylvia H. Duncan, Priya Date, et al. 2014. « Impact of Diet and Individual Variation on Intestinal Microbiota Composition and Fermentation Products in Obese Men ». *The ISME Journal* 8 (11): 2218-30. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.63>.
- Salvo Romero, Eloísa, Carmen Alonso Cotoner, Cristina Pardo Camacho, Maite Casado Bedmar, et María Vicario. 2015. « The Intestinal Barrier Function and Its Involvement in Digestive Disease ». *Revista Espanola De Enfermedades Digestivas: Organo Oficial De La Sociedad Espanola De Patologia Digestiva* 107 (11): 686-96. <https://doi.org/10.17235/reed.2015.3846/2015>.
- Salvo-Romero, Eloísa, Carmen Alonso-Cotoner, Cristina Pardo-Camacho, Maite Casado-Bedmar, et María Vicario. 2015. « The Intestinal Barrier Function and Its Involvement in Digestive Disease ». *Rev Esp Enferm Dig* 107: 10.
- Sas, David, Mingchang Hu, Orson W. Moe, et Michel Baum. 2008. « Effect of Claudins 6 and 9 on Paracellular Permeability in MDCK II Cells ». *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 295 (5): R1713-1719. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90596.2008>.
- Sasaki, Sei, et Yumi Noda. 2007. « Aquaporin-2 Protein Dynamics within the Cell ». *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 16 (4): 348-52. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e32818b27bf>.
- Sato, Toshiro, Robert G. Vries, Hugo J. Snippert, Marc van de Wetering, Nick Barker, Daniel E. Stange, Johan H. van Es, et al. 2009. « Single Lgr5 Stem Cells Build Crypt-Villus Structures in Vitro without a Mesenchymal Niche ». *Nature* 459 (7244): 262-65. <https://doi.org/10.1038/nature07935>.
- Schaffalitzky de Muckadell, O. B., O. Olsen, P. Cantor, et E. Magid. 1986. « Concentrations of Secretin and CCK in Plasma and Pancreatico-Biliary Secretion in Response to Intraduodenal Acid and Fat ». *Pancreas* 1 (6): 536-43. <https://doi.org/10.1097/00006676-198611000-00012>.
- Schier, R., A. McCall, G. P. Adams, K. W. Marshall, H. Merritt, M. Yim, R. S. Crawford, L. M. Weiner, C. Marks, et J. D. Marks. 1996. « Isolation of Picomolar Affinity Anti-c-ErbB-2 Single-Chain Fv by Molecular Evolution of the Complementarity Determining Regions in the Center of the Antibody Binding Site ». *Journal of Molecular Biology* 263 (4): 551-67. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0598>.

- Schilling, Oliver, Martin L. Binossek, Bettina Mayer, Brigitta Elsässer, Hans Brandstetter, Peter Goettig, Ulf-Håkan Stenman, et Hannu Koistinen. 2018. « Specificity Profiling of Human Trypsin-Isoenzymes ». *Biological Chemistry* 399 (9): 997-1007. <https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0107>.
- Schimpel, Christa, Birgit Teubl, Markus Absenger, Claudia Meindl, Eleonore Fröhlich, Gerd Leitinger, Andreas Zimmer, et Eva Roblegg. 2014. « Development of an Advanced Intestinal in Vitro Triple Culture Permeability Model To Study Transport of Nanoparticles ». *Molecular Pharmaceutics* 11 (3): 808-18. <https://doi.org/10.1021/mp400507g>.
- Schmidt, Morten, Henrik Toft Sørensen, et Lars Pedersen. 2018. « Diclofenac Use and Cardiovascular Risks: Series of Nationwide Cohort Studies ». *BMJ* 362 (septembre): k3426. <https://doi.org/10.1136/bmj.k3426>.
- Schneider, Christoph, Claire E. O'Leary, et Richard M. Locksley. 2019. « Regulation of Immune Responses by Tuft Cells ». *Nature Reviews. Immunology* 19 (9): 584-93. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0176-x>.
- Schneider, Sabine, Christina M. Wright, et Robert O. Heuckeroth. 2019. « Unexpected Roles for the Second Brain: Enteric Nervous System as Master Regulator of Bowel Function ». *Annual Review of Physiology* 81 (février): 235-59. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021317-121515>.
- Schoultz, Ida, et Åsa V. Keita. 2020. « The Intestinal Barrier and Current Techniques for the Assessment of Gut Permeability ». *Cells* 9 (8): 1909. <https://doi.org/10.3390/cells9081909>.
- Schubert, Mitchell L., et Jens F. Rehfeld. 2019. « Gastric Peptides-Gastrin and Somatostatin ». *Comprehensive Physiology* 10 (1): 197-228. <https://doi.org/10.1002/cphy.c180035>.
- Schutgens, Frans, et Hans Clevers. 2020. « Human Organoids: Tools for Understanding Biology and Treating Diseases ». *Annual Review of Pathology* 15 (janvier): 211-34. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032611>.
- Scialli, Anthony R., John M. DeSesso, et Charles B. Breckenridge. 2014. « Developmental Toxicity Studies with Atrazine and Its Major Metabolites in Rats and Rabbits ». *Birth Defects Research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology* 101 (3): 199-214. <https://doi.org/10.1002/bdrb.21099>.
- Sekirov, Inna, Shannon L. Russell, L. Caetano M. Antunes, et B. Brett Finlay. 2010. « Gut Microbiota in Health and Disease ». *Physiological Reviews* 90 (3): 859-904. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>.
- Shan, Wei, Xi Zhu, Min Liu, Lian Li, Jiaju Zhong, Wei Sun, Zhirong Zhang, et Yuan Huang. 2015. « Overcoming the Diffusion Barrier of Mucus and Absorption Barrier of Epithelium by Self-Assembled Nanoparticles for Oral Delivery of Insulin ». *ACS Nano* 9 (3): 2345-56. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b00028>.
- Shaner, Dale L., Galen Brunk, David Belles, Phil Westra, et Scott Nissen. 2006. « Soil Dissipation and Biological Activity of Metolachlor and S-Metolachlor in Five Soils ». *Pest Management Science* 62 (7): 617-23. <https://doi.org/10.1002/ps.1215>.
- Shao, Yan, Samuel C. Forster, Evdokia Tsaliki, Kevin Vervier, Angela Strang, Nandi Simpson, Nitin Kumar, et al. 2019. « Stunted Microbiota and Opportunistic Pathogen Colonization in Caesarean-Section Birth ». *Nature* 574 (7776): 117-21. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1560-1>.
- Shapira, Michael. 2016. « Gut Microbiotas and Host Evolution: Scaling Up Symbiosis ». *Trends in Ecology & Evolution* 31 (7): 539-49. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.03.006>.

- Shapiro, Lawrence, et William I. Weis. 2009. « Structure and Biochemistry of Cadherins and Catenins ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1 (3): a003053. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003053>.
- Sharom, F. J., R. Liu, Y. Romsicki, et P. Lu. 1999. « Insights into the Structure and Substrate Interactions of the P-Glycoprotein Multidrug Transporter from Spectroscopic Studies ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1461 (2): 327-45. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(99\)00166-2](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(99)00166-2).
- Shehata, Awad A., Wieland Schrödl, Alaa A. Aldin, Hafez M. Hafez, et Monika Krüger. 2013. « The Effect of Glyphosate on Potential Pathogens and Beneficial Members of Poultry Microbiota in Vitro ». *Current Microbiology* 66 (4): 350-58. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0277-2>.
- Sherly Carolyn, Justin, Daniel Selva Raj, Balasubramanian Malaikozhundan, Marimuthu Govindarajan, Naiyf S. Alharbi, Shine Kadaikunnan, Jamal M. Khaled, Mohammed N. Al-Anbr, Ahmed S. Alobaidi, et Baskaralingam Vaseeharan. 2019. « Anti-Cancer, Anti-Biofilm, and Anti-Inflammatory Properties of Hen's Albumen: A Photodynamic Approach ». *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 28 (décembre): 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.07.026>.
- Shimazaki, Youji, et Ayumi Takahashi. 2018. « Antibacterial Activity of Lysozyme-Binding Proteins from Chicken Egg White ». *Journal of Microbiological Methods* 154 (novembre): 19-24. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.10.001>.
- Shin, Moonshik, Donjin Jang, Hojung Nam, Kwang Hyung Lee, et Doheon Lee. 2018. « Predicting the Absorption Potential of Chemical Compounds Through a Deep Learning Approach ». *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics* 15 (2): 432-40. <https://doi.org/10.1109/TCBB.2016.2535233>.
- Silver, Sharon R., Steven J. Bertke, Cynthia J. Hines, Michael C.R. Alavanja, Jane A. Hoppin, Jay H. Lubin, Jennifer A. Rusiecki, Dale P. Sandler, et Laura E. Beane Freeman. 2015. « Cancer incidence and metolachlor use in the Agricultural Health Study: An update ». *International journal of cancer. Journal international du cancer* 137 (11): 2630-43. <https://doi.org/10.1002/ijc.29621>.
- Simmonds, W. J., T. G. Redgrave, et R. L. Willix. 1968. « Absorption of Oleic and Palmitic Acids from Emulsions and Micellar Solutions ». *The Journal of Clinical Investigation* 47 (5): 1015-25. <https://doi.org/10.1172/JCI105791>.
- Simon, Carola, et Rolf Daniel. 2011. « Metagenomic Analyses: Past and Future Trends ». *Applied and Environmental Microbiology* 77 (4): 1153-61. <https://doi.org/10.1128/AEM.02345-10>.
- . 2017. « Construction of Small-Insert and Large-Insert Metagenomic Libraries ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1539: 1-12. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6691-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6691-2_1).
- Simpkins, James W., James A. Swenberg, Noel Weiss, David Brusick, J. Charles Eldridge, James T. Stevens, Robert J. Handa, et al. 2011. « Atrazine and Breast Cancer: A Framework Assessment of the Toxicological and Epidemiological Evidence ». *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 123 (2): 441-59. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr176>.
- Sipos, Ferenc, et Orsolya Galamb. 2012. « Epithelial-to-Mesenchymal and Mesenchymal-to-Epithelial Transitions in the Colon ». *World Journal of Gastroenterology* 18 (7): 601-8. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i7.601>.
- Sivakumar, Padmanaban, Sumin Kim, Han Chang Kang, et Min Suk Shim. 2019. « Targeted SiRNA Delivery Using Aptamer-SiRNA Chimeras and Aptamer-Conjugated Nanoparticles ». *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology* 11 (3): e1543. <https://doi.org/10.1002/wnan.1543>.
- Sjöberg, Åsa, Mareike Lutz, Christer Tannergren, Caroline Wingolf, Anders Borde, et Anna-Lena Ungell. 2013. « Comprehensive Study on Regional Human Intestinal Permeability and Prediction of

- Fraction Absorbed of Drugs Using the Ussing Chamber Technique ». *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 48 (1-2): 166-80. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.10.007>.
- Sjölund, K., G. Sandén, R. Håkanson, et F. Sundler. 1983. « Endocrine Cells in Human Intestine: An Immunocytochemical Study ». *Gastroenterology* 85 (5): 1120-30.
- Skrypek, N., B. Duchêne, M. Hebbar, E. Leteurtre, I. van Seuning, et N. Jonckheere. 2013. « The MUC4 Mucin Mediates Gemcitabine Resistance of Human Pancreatic Cancer Cells via the Concentrative Nucleoside Transporter Family ». *Oncogene* 32 (13): 1714-23. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.179>.
- Smith, Steven B., et Jacques Ravel. 2017. « The vaginal microbiota, host defence and reproductive physiology ». *The Journal of Physiology* 595 (2): 451-63. <https://doi.org/10.1113/JP271694>.
- Snoeck, Veerle, Bruno Goddeeris, et Eric Cox. 2005. « The Role of Enterocytes in the Intestinal Barrier Function and Antigen Uptake ». *Microbes and Infection* 7 (7-8): 997-1004. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.04.003>.
- Solomon, Keith R., James A. Carr, Louis H. Du Preez, John P. Giesy, Ronald J. Kendall, Ernest E. Smith, et Glen J. Van Der Kraak. 2008. « Effects of Atrazine on Fish, Amphibians, and Aquatic Reptiles: A Critical Review ». *Critical Reviews in Toxicology* 38 (9): 721-72. <https://doi.org/10.1080/10408440802116496>.
- Sommer, Felix, et Fredrik Bäckhed. 2013. « The Gut Microbiota — Masters of Host Development and Physiology ». *Nature Reviews Microbiology* 11 (4): 227-38. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2974>.
- Soto-Gamez, Abel, Deng Chen, Anke G. E. Nabuurs, Wim J. Quax, Marco Demaria, et Ykelien L. Boersma. 2020. « A Bispecific Inhibitor of the EGFR/ADAM17 Axis Decreases Cell Proliferation and Migration of EGFR-Dependent Cancer Cells ». *Cancers* 12 (2): E411. <https://doi.org/10.3390/cancers12020411>.
- Srinivasan, Balaji, Aditya Reddy Kolli, Mandy Brigitte Esch, Hasan Erbil Abaci, Michael L. Shuler, et James J. Hickman. 2015. « TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems ». *Journal of laboratory automation* 20 (2): 107-26. <https://doi.org/10.1177/2211068214561025>.
- Stanfield, Robyn L., et Ian A. Wilson. 2014. « Antibody Structure ». *Microbiology Spectrum* 2 (2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AID-0012-2013>.
- Stara, Alzbeta, Jan Kubec, Eliska Zuskova, Milos Buric, Caterina Faggio, Antonin Kouba, et Josef Velisek. 2019. « Effects of S-Metolachlor and Its Degradation Product Metolachlor OA on Marbled Crayfish (*Procambarus Virginalis*) ». *Chemosphere* 224 (juin): 616-25. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.187>.
- Stedman, Aline, Giulia Nigro, et Philippe J. Sansonetti. 2016. « [Microbiota-intestinal stem cells dialog: a key element for intestinal regeneration] ». *Medecine Sciences: M/S* 32 (11): 983-90. <https://doi.org/10.1051/medsci/20163211014>.
- Steiner, Daniel, Patrik Forrer, et Andreas Plückthun. 2008. « Efficient Selection of DARPins with Sub-Nanomolar Affinities Using SRP Phage Display ». *Journal of Molecular Biology* 382 (5): 1211-27. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.07.085>.
- Steiner, M. S., et R. A. Morton. 1991. « Nutritional and Gastrointestinal Complications of the Use of Bowel Segments in the Lower Urinary Tract ». *The Urologic Clinics of North America* 18 (4): 743-54.

- Stephens, Matthew, et Pierre-Yves von der Weid. 2020. « Lipopolysaccharides Modulate Intestinal Epithelial Permeability and Inflammation in a Species-Specific Manner ». *Gut Microbes* 11 (3): 421-32. <https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1629235>.
- Stevens, Bruce R., Ruby Goel, Kim Seungbum, Elaine M. Richards, Richard C. Holbert, Carl J. Pepine, et Mohan K. Raizada. 2018. « Increased Human Intestinal Barrier Permeability Plasma Biomarkers Zonulin and FABP2 Correlated with Plasma LPS and Altered Gut Microbiome in Anxiety or Depression ». *Gut* 67 (8): 1555-57. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314759>.
- Su, Liping, Le Shen, Daniel R. Clayburgh, Sam C. Nalle, Erika A. Sullivan, Jon B. Meddings, Clara Abraham, et Jerrold R. Turner. 2009. « Targeted epithelial tight junction dysfunction causes immune activation and contributes to development of experimental colitis ». *Gastroenterology* 136 (2): 551-63. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.10.081>.
- Sun, Hao, et Dennis O. Scott. 2010. « Structure-Based Drug Metabolism Predictions for Drug Design ». *Chemical Biology & Drug Design* 75 (1): 3-17. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2009.00899.x>.
- Sun, Huanli, Jiwei Cui, Yi Ju, Xi Chen, Edgar H. H. Wong, Jenny Tran, Greg G. Qiao, et Frank Caruso. 2017. « Tuning the Properties of Polymer Capsules for Cellular Interactions ». *Bioconjugate Chemistry* 28 (7): 1859-66. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00168>.
- Susewind, Julia, Cristiane de Souza Carvalho-Wodarz, Urska Repnik, Eva-Maria Collnot, Nicole Schneider-Daum, Gareth Wyn Griffiths, et Claus-Michael Lehr. 2016. « A 3D Co-Culture of Three Human Cell Lines to Model the Inflamed Intestinal Mucosa for Safety Testing of Nanomaterials ». *Nanotoxicology* 10 (1): 53-62. <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1008065>.
- Suyama, Kimita, Irina Shapiro, Mitchell Guttman, et Rachel B. Hazan. 2002. « A Signaling Pathway Leading to Metastasis Is Controlled by N-Cadherin and the FGF Receptor ». *Cancer Cell* 2 (4): 301-14. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(02\)00150-2](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(02)00150-2).
- Tachibana, K., H. Nakanishi, K. Mandai, K. Ozaki, W. Ikeda, Y. Yamamoto, A. Nagafuchi, S. Tsukita, et Y. Takai. 2000. « Two Cell Adhesion Molecules, Nectin and Cadherin, Interact through Their Cytoplasmic Domain-Associated Proteins ». *The Journal of Cell Biology* 150 (5): 1161-76. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.5.1161>.
- Takahashi, Senye, Noriko Iwamoto, Hiroyuki Sasaki, Masato Ohashi, Yukako Oda, Shoichiro Tsukita, et Mikio Furuse. 2009. « The E3 Ubiquitin Ligase LNX1p80 Promotes the Removal of Claudins from Tight Junctions in MDCK Cells ». *Journal of Cell Science* 122 (Pt 7): 985-94. <https://doi.org/10.1242/jcs.040055>.
- Takeichi, Masatoshi. 2014. « Dynamic Contacts: Rearranging Adherens Junctions to Drive Epithelial Remodelling ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15 (6): 397-410. <https://doi.org/10.1038/nrm3802>.
- Takenaka, Toru, Naomoto Harada, Jiro Kuze, Masato Chiba, Takahiro Iwao, et Tamihide Matsunaga. 2016. « Application of a Human Intestinal Epithelial Cell Monolayer to the Prediction of Oral Drug Absorption in Humans as a Superior Alternative to the Caco-2 Cell Monolayer ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 105 (2): 915-24. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2015.11.035>.
- Tampio, Marjo, Piia Markkanen, Katja A. Puttonen, Eveliina Hagelberg, Hannu Heikkinen, Kati Huhtinen, Jarkko Loikkanen, Maija-Riitta Hirvonen, et Kirsi H. Vähäkangas. 2009. « Induction of PUMA- $\alpha$  and down-Regulation of PUMA- $\beta$  Expression Is Associated with Benzo(a)Pyrene-Induced Apoptosis in MCF-7 Cells ». *Toxicology Letters* 188 (3): 214-22. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.04.016>.

- Tamura, Atsushi, Hisayoshi Hayashi, Mitsunobu Imasato, Yuji Yamazaki, Asuka Hagiwara, Masami Wada, Tetsuo Noda, Mitsuhiro Watanabe, Yuichi Suzuki, et Sachiko Tsukita. 2011. « Loss of Claudin-15, but Not Claudin-2, Causes Na<sup>+</sup> Deficiency and Glucose Malabsorption in Mouse Small Intestine ». *Gastroenterology* 140 (3): 913-23. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.08.006>.
- Tan, Hsih-Yin, Sofie Trier, Ulrik L. Rahbek, Martin Dufva, Jörg P. Kutter, et Thomas L. Andresen. 2018. « A multi-chamber microfluidic intestinal barrier model using Caco-2 cells for drug transport studies ». *PLoS ONE* 13 (5): e0197101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197101>.
- Tans, Roel, Danique M. H. van Rijswijck, Alex Davidson, Ryan Hannam, Bryon Ricketts, Cees J. Tack, Hans J. C. T. Wessels, Jolein Gloerich, et Alain J. van Gool. 2020. « Affimers as an Alternative to Antibodies for Protein Biomarker Enrichment ». *Protein Expression and Purification* 174 (octobre): 105677. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105677>.
- Taylor, Sean C., Thomas Berkelman, Geetha Yadav, et Matt Hammond. 2013. « A Defined Methodology for Reliable Quantification of Western Blot Data ». *Molecular Biotechnology* 55 (3): 217-26. <https://doi.org/10.1007/s12033-013-9672-6>.
- Tetering, Geert van, Mitchell Evers, Chilam Chan, Marjolein Stip, et Jeanette Leusen. 2020. « Fc Engineering Strategies to Advance IgA Antibodies as Therapeutic Agents ». *Antibodies (Basel, Switzerland)* 9 (4): E70. <https://doi.org/10.3390/antib9040070>.
- Thanou, M., M. T. Nihot, M. Jansen, J. C. Verhoef, et H. E. Junginger. 2001. « Mono-N-Carboxymethyl Chitosan (MCC), a Polyampholytic Chitosan Derivative, Enhances the Intestinal Absorption of Low Molecular Weight Heparin across Intestinal Epithelia in Vitro and in Vivo ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 90 (1): 38-46. [https://doi.org/10.1002/1520-6017\(200101\)90:1<38::aid-jps5>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/1520-6017(200101)90:1<38::aid-jps5>3.0.co;2-3).
- Thomas, William A., Cécile Boscher, Yeh-Shiu Chu, Damien Cuvelier, Clara Martinez-Rico, Rima Seddiki, Julie Heysch, et al. 2013. «  $\alpha$ -Catenin and Vinculin Cooperate to Promote High E-Cadherin-Based Adhesion Strength ». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (7): 4957-69. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.403774>.
- Thomson, Amanda, Kathryn Smart, Michelle S. Somerville, Sarah N. Lauder, Gautham Appanna, James Horwood, Lawrence Sunder Raj, et al. 2019. « The Ussing Chamber System for Measuring Intestinal Permeability in Health and Disease ». *BMC Gastroenterology* 19 (1): 98. <https://doi.org/10.1186/s12876-019-1002-4>.
- Thorpe, Nancy, et Adel Shirmohammadi. 2005. « Herbicides and Nitrates in Groundwater of Maryland and Childhood Cancers: A Geographic Information Systems Approach ». *Journal of Environmental Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews* 23 (2): 261-78. <https://doi.org/10.1080/10590500500235001>.
- Thorson, Jennifer L. M., Daniel Beck, Millissia Ben Maamar, Eric E. Nilsson, Margaux McBirney, et Michael K. Skinner. 2020. « Epigenome-Wide Association Study for Atrazine Induced Transgenerational DNA Methylation and Histone Retention Sperm Epigenetic Biomarkers for Disease ». *PLoS One* 15 (12): e0239380. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239380>.
- Tiede, Christian, Robert Bedford, Sophie J. Heseltine, Gina Smith, Imeshi Wijetunga, Rebecca Ross, Danah AlQallaf, et al. 2017. « Affimer Proteins Are Versatile and Renewable Affinity Reagents ». *eLife* 6 (juin): e24903. <https://doi.org/10.7554/eLife.24903>.
- Tixier, C., M. Sancelme, F. Bonnemoy, A. Cuer, et H. Veschambre. 2001. « Degradation Products of a Phenylurea Herbicide, Diuron: Synthesis, Ecotoxicity, and Biotransformation ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (7): 1381-89. [https://doi.org/10.1897/1551-5028\(2001\)020<1381:dpoaph>2.0.co;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(2001)020<1381:dpoaph>2.0.co;2).

- Tom, B. H., L. P. Rutzky, M. M. Jakstys, R. Oyasu, C. I. Kaye, et B. D. Kahan. 1976. « Human Colonic Adenocarcinoma Cells. I. Establishment and Description of a New Line ». *In Vitro* 12 (3): 180-91. <https://doi.org/10.1007/BF02796440>.
- Turner, Jerrold R., Mary M. Buschmann, Isabel Romero-Calvo, Anne Sailer, et Le Shen. 2014. « The Role of Molecular Remodeling in Differential Regulation of Tight Junction Permeability ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 36 (décembre): 204-12. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2014.09.022>.
- Twarog, Caroline, Sarinj Fattah, Joanne Heade, Sam Maher, Elias Fattal, et David J. Brayden. 2019. « Intestinal Permeation Enhancers for Oral Delivery of Macromolecules: A Comparison between Salcaprozate Sodium (SNAC) and Sodium Caprate (C10) ». *Pharmaceutics* 11 (2): E78. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11020078>.
- Tyx, R. E., A. J. Rivera, L. M. Keong, et S. B. Stanfill. 2020. « An Exploration of Smokeless Tobacco Product Nucleic Acids: A Combined Metagenome and Metatranscriptome Analysis ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 104 (2): 751-63. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10232-3>.
- Ubags, Niki D. J., et Benjamin J. Marsland. 2019. « Chapter 12 - Obesity and the Microbiome: Big Changes on a Small Scale? » In *Mechanisms and Manifestations of Obesity in Lung Disease*, édité par Richard A. Johnston et Benjamin T. Suratt, 281-300. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813553-2.00012-9>.
- Ueno, Yoshitomo, Saya Ozaki, Akihiro Umakoshi, Hajime Yano, Mohammed E. Choudhury, Naoki Abe, Yutaro Sumida, et al. 2019. « Chloride Intracellular Channel Protein 2 in Cancer and Non-Cancer Human Tissues: Relationship with Tight Junctions ». *Tissue Barriers* 7 (1): 1593775. <https://doi.org/10.1080/21688370.2019.1593775>.
- Uesaka, Toshihiro, Heather M. Young, Vassilis Pachnis, et Hideki Enomoto. 2016. « Development of the Intrinsic and Extrinsic Innervation of the Gut ». *Developmental Biology, Enteric Nervous System*, 417 (2): 158-67. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.04.016>.
- UmaMaheswari, Thiyagamoorthy, Thiagarajan Hemalatha, Palavesam Sankaranarayanan, et Rengarajulu Puvanakrishnan. 2016. « Enzyme Therapy: Current Perspectives ». *Indian Journal of Experimental Biology* 54 (1): 7-16.
- Ussing, H. H., et K. Zerahn. 1999. « Active Transport of Sodium as the Source of Electric Current in the Short-Circuited Isolated Frog Skin. Reprinted from Acta. Physiol. Scand. 23: 110-127, 1951 ». *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 10 (9): 2056-65.
- Usui, Kimihito, Satoshi Nishida, Takuya Sugita, Takuro Ueki, Yasuhiko Matsumoto, Hidenobu Okumura, et Kazuhisa Sekimizu. 2016. « Acute Oral Toxicity Test of Chemical Compounds in Silkworms ». *Drug Discoveries & Therapeutics* 10 (1): 57-61. <https://doi.org/10.5582/ddt.2016.01025>.
- Vagin, Olga, George Sachs, et Elmira Tokhtaeva. 2007. « The Roles of the Na,K-ATPase Beta 1 Subunit in Pump Sorting and Epithelial Integrity ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 39 (5-6): 367-72. <https://doi.org/10.1007/s10863-007-9103-0>.
- Van Itallie, Christina M., Alan S. Fanning, et James M. Anderson. 2003. « Reversal of Charge Selectivity in Cation or Anion-Selective Epithelial Lines by Expression of Different Claudins ». *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 285 (6): F1078-1084. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00116.2003>.
- Van Itallie, Christina M., Sarah Rogan, Alan Yu, Lucia Seminario Vidal, Jennifer Holmes, et James M. Anderson. 2006. « Two Splice Variants of Claudin-10 in the Kidney Create Paracellular Pores with Different Ion Selectivities ». *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 291 (6): F1288-1299. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00138.2006>.

- Van Itallie, Christina, Christoph Rahner, et James Melvin Anderson. 2001. « Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability ». *Journal of Clinical Investigation* 107 (10): 1319-27.
- Vardakou, Maria, Annalisa Mercuri, Susan A. Barker, Duncan Q. M. Craig, Richard M. Faulks, et Martin S. J. Wickham. 2011. « Achieving Antral Grinding Forces in Biorelevant in Vitro Models: Comparing the USP Dissolution Apparatus II and the Dynamic Gastric Model with Human in Vivo Data ». *AAPS PharmSciTech* 12 (2): 620-26. <https://doi.org/10.1208/s12249-011-9616-z>.
- Várnagy, L., P. Budai, S. Fejes, M. Susan, T. Fánsci, M. Keseru, et R. Szabó. 2003. « Toxicity and Degradation of Metolachlor (Dual Gold 960 EC) in Chicken Embryos ». *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 68 (4 Pt B): 807-11.
- Vasiluk, Luba, Linda J. Pinto, et Margo M. Moore. 2005. « Oral Bioavailability of Glyphosate: Studies Using Two Intestinal Cell Lines ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 24 (1): 153-60. <https://doi.org/10.1897/04-088r.1>.
- Vatier, J., C. Célice-Pingaud, et R. Farinotti. 1998. « Interests of the “artificial Stomach” Techniques to Study Antacid Formulations: Comparison with in Vivo Evaluation ». *Fundamental & Clinical Pharmacology* 12 (6): 573-83. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.1998.tb00989.x>.
- Venhuis, Sarah Hatfield, et Mehrab Mehrvar. 2004. « Health Effects, Environmental Impacts, and Photochemical Degradation of Selected Surfactants in Water ». *International Journal of Photoenergy* 6 (3): 115-25. <https://doi.org/10.1155/S1110662X04000157>.
- Vergnolle, Nathalie, et Carla Cirillo. 2018. « Neurons and Glia in the Enteric Nervous System and Epithelial Barrier Function ». *Physiology (Bethesda, Md.)* 33 (4): 269-80. <https://doi.org/10.1152/physiol.00009.2018>.
- Vertzoni, Maria, Amalia Diakidou, Manos Chatziliadis, Erik Söderlind, Bertil Abrahamsson, Jennifer B. Dressman, et Christos Reppas. 2010. « Biorelevant Media to Simulate Fluids in the Ascending Colon of Humans and Their Usefulness in Predicting Intracolonic Drug Solubility ». *Pharmaceutical Research* 27 (10): 2187-96. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0223-6>.
- Vertzoni, Maria, Jennifer Dressman, James Butler, John Hempenstall, et Christos Reppas. 2005. « Simulation of Fasting Gastric Conditions and Its Importance for the in Vivo Dissolution of Lipophilic Compounds ». *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 60 (3): 413-17. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.03.002>.
- Virtanen, Jyrki K., Sari Voutilainen, Tiina H. Rissanen, Jaakko Mursu, Tomi-Pekka Tuomainen, Maarit J. Korhonen, Veli-Pekka Valkonen, Kari Seppänen, Jari A. Laukkanen, et Jukka T. Salonen. 2005. « Mercury, Fish Oils, and Risk of Acute Coronary Events and Cardiovascular Disease, Coronary Heart Disease, and All-Cause Mortality in Men in Eastern Finland ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25 (1): 228-33. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000150040.20950.61>.
- Vivacqua, Adele, Enrica Romeo, Paola De Marco, Ernestina Marianna De Francesco, Sergio Abonante, et Marcello Maggiolini. 2012. « GPER Mediates the Egr-1 Expression Induced by 17 $\beta$ -Estradiol and 4-Hydroxitamoxifen in Breast and Endometrial Cancer Cells ». *Breast Cancer Research and Treatment* 133 (3): 1025-35. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1901-8>.
- Vogt, Martin, et Arne Skerra. 2004. « Construction of an Artificial Receptor Protein (“anticalin”) Based on the Human Apolipoprotein D ». *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology* 5 (2): 191-99. <https://doi.org/10.1002/cbic.200300703>.
- Vojdani, Aristo. 2013. « For the Assessment of Intestinal Permeability, Size Matters ». *Alternative Therapies in Health and Medicine* 19 (1): 12-24.

## REFERENCES

---

- Vonk, J. Arie, et Michiel H. S. Kraak. 2020. « Herbicide Exposure and Toxicity to Aquatic Primary Producers ». *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 250: 119-71. [https://doi.org/10.1007/398\\_2020\\_48](https://doi.org/10.1007/398_2020_48).
- Wagner, Carol L., Sarah N. Taylor, et Donna Johnson. 2008. « Host Factors in Amniotic Fluid and Breast Milk That Contribute to Gut Maturation ». *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 34 (2): 191-204. <https://doi.org/10.1007/s12016-007-8032-3>.
- Wagner, Norman, Wolfram Reichenbecher, Hanka Teichmann, Beatrix Tappeser, et Stefan Lötters. 2013. « Questions Concerning the Potential Impact of Glyphosate-Based Herbicides on Amphibians ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 32 (8): 1688-1700. <https://doi.org/10.1002/etc.2268>.
- Wahyuni, Eva Ari, Heng-Dao Lin, Che-Wei Lu, Chih Ming Kao, et Ssu-Ching Chen. 2021. « The Cytotoxicity and Genotoxicity of Single and Combined Fenthion and Terbufos Treatments in Human Liver Cells and Zebrafish Embryos ». *The Science of the Total Environment* 758 (mars): 143597. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143597>.
- Wan, Lin-Yan, Wen-Fang Yuan, Wen-Bing Ai, Yao-Wei Ai, Jiao-Jiao Wang, Liang-Yin Chu, Yan-Qiong Zhang, et Jiang-Feng Wu. 2019. « An Exploration of Aptamer Internalization Mechanisms and Their Applications in Drug Delivery ». *Expert Opinion on Drug Delivery* 16 (3): 207-18. <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1575808>.
- Wang, Lihong, Tingjiao Liu, Yao Wang, Lei Cao, Mai Nishioka, Rodelio L. Aguirre, Ayataka Ishikawa, Li Geng, et Norihiko Okada. 2007. « Altered Expression of Desmocollin 3, Desmoglein 3, and  $\beta$ -Catenin in Oral Squamous Cell Carcinoma: Correlation with Lymph Node Metastasis and Cell Proliferation ». *Virchows Archiv* 451 (5): 959-66. <https://doi.org/10.1007/s00428-007-0485-5>.
- Wang, Xinhua, Mary Mathieu, et Randall J. Brezski. 2018. « IgG Fc Engineering to Modulate Antibody Effector Functions ». *Protein & Cell* 9 (1): 63-73. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0473-8>.
- Wawrezinieck, Anne, Jean-Manuel Péan, Patrick Wüthrich, et Jean-Pierre Benoit. 2008. « Biodisponibilité et vecteurs particuliers pour la voie orale ». *Médecine/sciences* 24 (6-7): 659-64. <https://doi.org/10.1051/medsci/20082467659>.
- Walti, M. 1986. « Laws Governing Degeneration of the Genetic Code ». *Acta Biotheoretica* 35 (1-2): 3-14. <https://doi.org/10.1007/BF00118364>.
- Westergaard, E., et M. W. Brightman. 1973. « Transport of Proteins across Normal Cerebral Arterioles ». *The Journal of Comparative Neurology* 152 (1): 17-44. <https://doi.org/10.1002/cne.901520103>.
- Weydert, Christine J., et Joseph J. Cullen. 2010. « Measurement of Superoxide Dismutase, Catalase and Glutathione Peroxidase in Cultured Cells and Tissue ». *Nature Protocols* 5 (1): 51-66. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.197>.
- Whiteman, Eileen L., Shuling Fan, Jennifer L. Harder, Katherine D. Walton, Chia-Jen Liu, Abdul Soofi, Vanessa C. Fogg, et al. 2014. « Crumbs3 Is Essential for Proper Epithelial Development and Viability ». *Molecular and Cellular Biology* 34 (1): 43-56. <https://doi.org/10.1128/MCB.00999-13>.
- Wiener, J., D. Spiro, et W. R. Loewenstein. 1964. « STUDIES ON AN EPITHELIAL (GLAND) CELL JUNCTION. II. SURFACE STRUCTURE ». *The Journal of Cell Biology* 22 (septembre): 587-98. <https://doi.org/10.1083/jcb.22.3.587>.
- Wijck, Kim van, Thomas J. M. Verlinden, Hans M. H. van Eijk, Jan Dekker, Wim A. Buurman, Cornelis H. C. Dejong, et Kaatje Lenaerts. 2013. « Novel Multi-Sugar Assay for Site-Specific Gastrointestinal

- Permeability Analysis: A Randomized Controlled Crossover Trial ». *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)* 32 (2): 245-51. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2012.06.014>.
- Wilkinson, Adam D., Catherine J. Collier, Florita Flores, et Andrew P. Negri. 2015. « Acute and Additive Toxicity of Ten Photosystem-II Herbicides to Seagrass ». *Scientific Reports* 5 (novembre): 17443. <https://doi.org/10.1038/srep17443>.
- Wilson, Ian D., et Jeremy K. Nicholson. 2017. « Gut Microbiome Interactions with Drug Metabolism, Efficacy, and Toxicity ». *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 179 (janvier): 204-22. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.08.002>.
- Winne, D. 1989. « Effect of Villosity and Distension on the Absorptive and Secretory Flux in the Small Intestine ». *Journal of Theoretical Biology* 139 (2): 155-86. [https://doi.org/10.1016/s0022-5193\(89\)80098-0](https://doi.org/10.1016/s0022-5193(89)80098-0).
- Wols, B. A., et C. H. M. Hofman-Caris. 2012. « Review of Photochemical Reaction Constants of Organic Micropollutants Required for UV Advanced Oxidation Processes in Water ». *Water Research* 46 (9): 2815-27. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.03.036>.
- Wong, Sunny H., et Jun Yu. 2019. « Gut Microbiota in Colorectal Cancer: Mechanisms of Action and Clinical Applications ». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 16 (11): 690-704. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0209-8>.
- Wood, R. A. 2017. « Oral Immunotherapy for Food Allergy ». *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology* 27 (3): 151-59. <https://doi.org/10.18176/jiaci.0143>.
- Worthington, J. J., F. Reimann, et F. M. Gribble. 2018. « Enteroendocrine Cells-Sensory Sentinels of the Intestinal Environment and Orchestrators of Mucosal Immunity ». *Mucosal Immunology* 11 (1): 3-20. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.73>.
- Wosu, L., R. Parisella, et N. Kalant. 1983. « Effect of Low Density Lipoprotein on Glycosaminoglycan Secretion by Cultured Human Smooth Muscle Cells and Fibroblasts. Influence of Serum Concentration and Cell Proliferation Rate ». *Atherosclerosis* 48 (3): 205-20. [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(83\)90039-4](https://doi.org/10.1016/0021-9150(83)90039-4).
- Wu, Gary D., Jun Chen, Christian Hoffmann, Kyle Bittinger, Ying-Yu Chen, Sue A. Keilbaugh, Meenakshi Bewtra, et al. 2011. « Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes ». *Science* 334 (6052): 105-8. <https://doi.org/10.1126/science.1208344>.
- Wu, Yanping, Li Tang, Baikui Wang, Qiming Sun, Pengwei Zhao, et Weifen Li. 2019. « The Role of Autophagy in Maintaining Intestinal Mucosal Barrier ». *Journal of Cellular Physiology* 234 (11): 19406-19. <https://doi.org/10.1002/jcp.28722>.
- Yahiaoui, O., L. Aizel, H. Lounici, N. Drouiche, M. F. A. Goosen, A. Pauss, et N. Mameri. 2011. « Evaluating Removal of Metribuzin Pesticide from Contaminated Groundwater Using an Electrochemical Reactor Combined with Ultraviolet Oxidation ». *Desalination* 270 (1): 84-89. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.11.025>.
- Yamamoto, T., N. Harada, K. Kano, S. Taya, E. Canaani, Y. Matsuura, A. Mizoguchi, C. Ide, et K. Kaibuchi. 1997. « The Ras Target AF-6 Interacts with ZO-1 and Serves as a Peripheral Component of Tight Junctions in Epithelial Cells ». *The Journal of Cell Biology* 139 (3): 785-95. <https://doi.org/10.1083/jcb.139.3.785>.
- Yan, Hui, et Kolapo M. Ajuwon. 2017. « Butyrate Modifies Intestinal Barrier Function in IPEC-J2 Cells through a Selective Upregulation of Tight Junction Proteins and Activation of the Akt Signaling Pathway ». *PLoS One* 12 (6): e0179586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179586>.
- Yandza, Thierry, Michel Tauc, Marie-Christine Saint-Paul, Mehdi Ouaisi, Jean Gugenheim, et Xavier Hébuterne. 2012. « The Pig as a Preclinical Model for Intestinal Ischemia-Reperfusion and

- Transplantation Studies ». *The Journal of Surgical Research* 178 (2): 807-19. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2012.07.025>.
- Yang, Lihua, Emma Ivantsova, Christopher L. Souders, et Christopher J. Martyniuk. 2021. « The Agrochemical S-Metolachlor Disrupts Molecular Mediators and Morphology of the Swim Bladder: Implications for Locomotor Activity in Zebrafish (*Danio Rerio*) ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 208 (janvier): 111641. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111641>.
- Yang, Shaochen, Jinling Liu, Xiangyang Bi, Yongqiang Ning, Shengying Qiao, Qianqian Yu, et Jie Zhang. 2020. « Risks Related to Heavy Metal Pollution in Urban Construction Dust Fall of Fast-Developing Chinese Cities ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 197 (juillet): 110628. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110628>.
- Yang, W. P., K. Green, S. Pinz-Sweeney, A. T. Briones, D. R. Burton, et C. F. Barbas. 1995. « CDR Walking Mutagenesis for the Affinity Maturation of a Potent Human Anti-HIV-1 Antibody into the Picomolar Range ». *Journal of Molecular Biology* 254 (3): 392-403. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0626>.
- Youn, Nam Hee, Eun Ji Kim, Jung-Sun Yi, Joo Hwan Kim, Ye-Jin Cho, Ki Taek Nam, Ki Sook Park, et Jong Kwon Lee. 2020. « Evaluation of Skin Phototoxicity of Transdermally Administered Pharmaceuticals in Sprague-Dawley Rats ». *Laboratory Animal Research* 36 (1): 42. <https://doi.org/10.1186/s42826-020-00074-w>.
- Yu, Alan S. L., Mary H. Cheng, Susanne Angelow, Dorothee Günzel, Sanae A. Kanzawa, Eveline E. Schneeberger, Michael Fromm, et Rob D. Coalson. 2009. « Molecular Basis for Cation Selectivity in Claudin-2-Based Paracellular Pores: Identification of an Electrostatic Interaction Site ». *The Journal of General Physiology* 133 (1): 111-27. <https://doi.org/10.1085/jgp.200810154>.
- Yu, Alan S. L., Alissa H. Enck, Wayne I. Lencer, et Eveline E. Schneeberger. 2003. « Claudin-8 Expression in Madin-Darby Canine Kidney Cells Augments the Paracellular Barrier to Cation Permeation ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (19): 17350-59. <https://doi.org/10.1074/jbc.M213286200>.
- Yu, Qinghua, Zhisheng Wang, Pengcheng Li, et Qian Yang. 2013. « The effect of various absorption enhancers on tight junction in the human intestinal Caco-2 cell line ». *Drug Development and Industrial Pharmacy* 39 (4): 587-92. <https://doi.org/10.3109/03639045.2012.692376>.
- Zeiger, Errol. 2019. « The Test That Changed the World: The Ames Test and the Regulation of Chemicals ». *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 841 (mai): 43-48. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.05.007>.
- Zeljezic, Davor, Vera Garaj-Vrhovac, et Petra Perkovic. 2006. « Evaluation of DNA Damage Induced by Atrazine and Atrazine-Based Herbicide in Human Lymphocytes in Vitro Using a Comet and DNA Diffusion Assay ». *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 20 (6): 923-35. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.01.017>.
- Zhang, Cong, Xue-Nan Li, Li-Run Xiang, Lei Qin, Jia Lin, et Jin-Long Li. 2017. « Atrazine Triggers Hepatic Oxidative Stress and Apoptosis in Quails (*Coturnix C. Coturnix*) via Blocking Nrf2-Mediated Defense Response ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 137 (mars): 49-56. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.11.016>.
- Zhang, Tianfeng, Xiaohan Gao, Xue Luo, Lianbing Li, Mingfu Ma, Yijian Zhu, Letian Zhao, et Renyan Li. 2019. « The Effects of Long-Term Exposure to Low Doses of Cadmium on the Health of the next Generation of Mice ». *Chemico-Biological Interactions* 312 (octobre): 108792. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108792>.

## REFERENCES

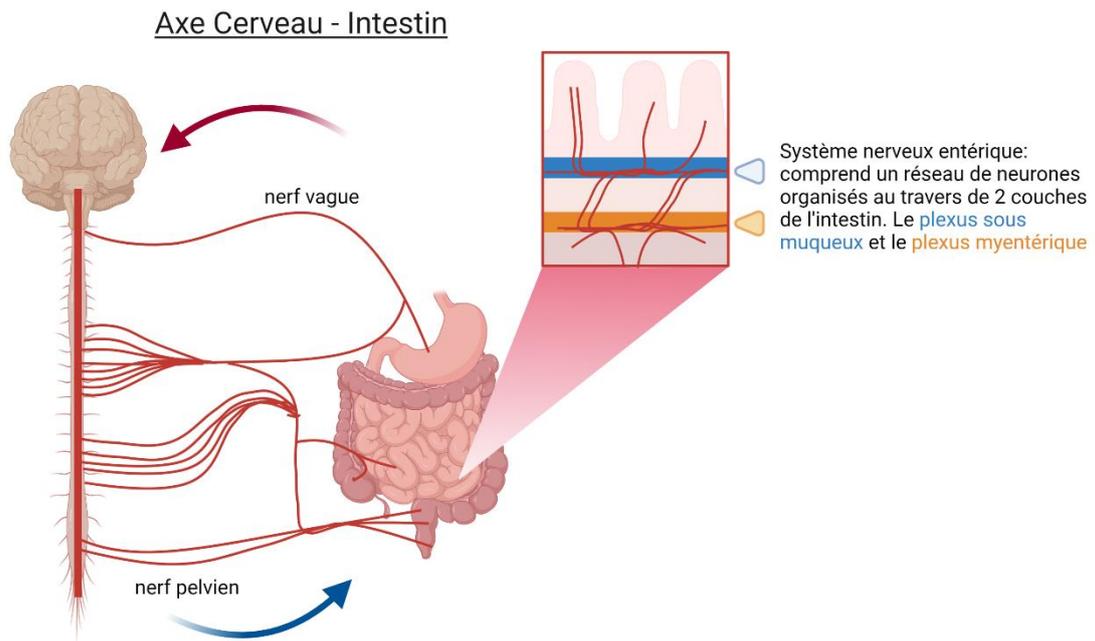
---

- Zhang, Yan, Changyuan Wang, Zhihao Liu, Qiang Meng, Xiaokui Huo, Qi Liu, Pengyuan Sun, et al. 2018. « P-Gp Is Involved in the Intestinal Absorption and Biliary Excretion of Afatinib in Vitro and in Rats ». *Pharmacological Reports* 70 (2): 243-50. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.10.005>.
- Zhou, Jie, Shuo Huang, Zhongyu Wang, Jiani Huang, Liang Xu, Xuefeng Tang, Yisong Y. Wan, et al. 2019. « Targeting EZH2 Histone Methyltransferase Activity Alleviates Experimental Intestinal Inflammation ». *Nature Communications* 10 (1): 2427. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10176-2>.

## **ANNEXES**

Annexe I : Organisation du système nerveux entérique.....	279
Annexe II: Classification des herbicides (Calvet et al. 2005).....	280
Annexe III : Propriété physico-chimique de l'atrazine et de ses métabolites...	281
Annexe IV : Propriété physico-chimique du S-métolachlore et de ses métabolites .....	281
Annexe V : tableau des amorces de qPCR.....	282
ANNEXE VI : Revue sur les modèles de cultures 3D des sarcomes osseux.....	283

## Annexe I : Organisation du système nerveux entérique



## Annexe II: Classification des herbicides (Calvet et al. 2005)

Mode d'action		Famille chimique
<b>Herbicides affectant la photosynthèse</b>	Blocage de la protéine D1 du photosystème II	Amides Benzothiadiazones Carbamates Pyridazinones Hydroxybenzonnitriles <b>Triazine</b> Urée
	Inhibiteur de la photosynthèse par détournement d'électrons à la sortie du photosystème I	Bipyridinium
<b>Herbicides inhibiteurs de la synthèse des lipides</b>	Inhibition de l'enzyme ACCase	Acides arylphénoxy-propioniques Cyclohexanediones oximes
	Inhibition des élongases (enzymes conduisant aux acides gras de plus de 18C)	Acides organiques halogénés benzofuranes
	Inhibition des élongases et des enzymes conduisant aux gibbéréllines	Acétamides <b>Choloroacétanilides</b> Oxyacétamides thiocarbamates
<b>Herbicides inhibiteurs de la synthèse des acides aminés</b>	Inhibition de l'enzyme conduisant à la synthèse de la glutamine	Aminophosphonates Acides phosphiniques
	Inhibition de l'enzyme conduisant à la synthèse des acides aminés aromatiques	Organophosphorés Glycines
	Inhibition de l'enzyme conduisant à la synthèse des acides aminés ramifiés	Imidazolines Sulfonylurées triazolopyrimidines
<b>Herbicides perturbant la régulation de l'auxine</b>	Herbicides auxiniques	Acides phénoxyalcanoïques Acides benzoïques Acides pyrimidiques Acides quinoléine-carboxyliques
<b>Herbicides inhibiteurs de la division cellulaire à la métaphase</b>	Herbicides bloquant les MTOC et désorganisant les fuseaux achromatiques	Carbamates
<b>Herbicides perturbant la croissance</b>	Inhibiteurs de transport auxinique et inversion du géotropisme	Acides phtaliques
	Inhibiteur de la synthèse de la cellulose de la paroi pecto-cellulosique	Acides quinoléines carboxyliques Benzamines benzonnitriles

## Annexe III : Propriété physico-chimique de l'atrazine et de ses métabolites

	Atrazine	DEA	DIA	DEDIA
CAS	1912-24-9	6190-65-4	1007-28-9	3397-62-4
Nom UICPA	1-chloro-3-éthylamino-5-isopropylamino-2,4,6-triazine	2-Amino-4-(isopropyl-d7-amino)-6-chloro-triazine	2-chloro-4-(éthylamino)-6-amino-s-triazine	6-Chloro-1,3,5-triazine-2,4-diamine
Formule	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>5</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub>	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> ClN <sub>5</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> ClN <sub>5</sub>
Masse molaire (à 25°C)	215,6 g/mol	187,6 g/mol	173,6 g/mol	145,5 g/mol
Solubilité dans l'eau (à 25°C)	34,7 mg/L			

## Annexe IV : Propriété physico-chimique du S-métolachlore et de ses métabolites

	S-Métolachlore	ESA-Métolachlore	OXA-Métolachlore
CAS		171118-09-5	152019-73-3
Nom UICPA	(RS)-2-chloro-N-(2-éthyl-6-méthylphényl)-N-(1-méthoxypropan-2-yl)acétamide	2-[(2-ethyl-6-methylphenyl)(2-methoxy-1-methylethyl)amino]-2-oxo- ethanesulfonic acid	2-[(2-ethyl-6-methylphenyl)(2-methoxy-1-methylethyl)amino]-2-oxo- acetic acid
Formule	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>2</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>5</sub> S	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>
Masse molaire (à 25°C)	283,8 g/mol	328,4 g/mol	279,3 g/mol
Solubilité dans l'eau (à 25°C)	488 mg/L		

## Annexe V : tableau des amorces de qPCR

<b>Gènes</b>	<b>Amorce Forward</b>	<b>Amorce Reverse</b>
<b>Actine</b>	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA
<b>ZO-1</b>	CAAGATAGTTTGGCAGCAAGAGATG	ATCAGGGACATTCAATAGCGTAGC
<b>OCLN</b>	AAGAGTTGACAGTCCCATGGCATAAC	ATCCACAGGCGAAGTTAATGGAAG
<b>CL-1</b>	CCGGCGACAACATCGTGAC	CGGGTTGCTTGCAATGTGC
<b>E-cad</b>	CTCGACACCCGATTCAAAGTG	CCAGAAACGGAGGCCTGATG

## ANNEXE VI : Revue sur les modèles de cultures 3D des sarcomes osseux

Journal of Bone Oncology 30 (2021) 100379



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Bone Oncology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jbo](http://www.elsevier.com/locate/jbo)

## Review Article

*In vitro* three-dimensional cell cultures for bone sarcomas

Javier Munoz-Garcia<sup>a,b,\*</sup>, Camille Jubelin<sup>a,b,c,1</sup>, Aurélie Loussouarn<sup>a</sup>, Matisse Goumar<sup>a,b</sup>,  
Laurent Griscorn<sup>d</sup>, Axelle Renodon-Cornière<sup>a</sup>, Marie-Françoise Heymann<sup>a,b</sup>, Dominique Heymann<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Université de Nantes, INSERM, Nantes, France<sup>b</sup> Institut de Cancérologie de l'Ouest, Tumour Heterogeneity and Precision Medicine Laboratory, Saint-Herblain, France<sup>c</sup> Atlantic Bone Screen, Saint-Herblain, France<sup>d</sup> BIOSIT CNRS UMS3480, Université de Rennes-1, Rennes, France<sup>e</sup> University of Sheffield, Department of Oncology and Metabolism, Medical School, Sheffield, UK

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 6 May 2021

Revised 24 June 2021

Accepted 26 June 2021

Available online 6 July 2021

## Keywords:

Osteosarcoma

Ewing sarcoma

Chondrosarcoma

Extracellular matrix

3D culture

Multicellular tumour spheroid

Scaffold-based 3D culture

Microfluidics

Bioprinting

## ABSTRACT

Bone sarcomas are rare tumour entities that arise from the mesenchyme most of which are highly heterogeneous at the cellular, genetic and epigenetic levels. The three main types are osteosarcoma, Ewing sarcoma, and chondrosarcoma. These oncological entities are characterised by high morbidity and mortality and an absence of significant therapeutic improvement in the last four decades. In the field of oncology, *in vitro* cultures of cancer cells have been extensively used for drug screening unfortunately with limited success. Indeed, despite the massive knowledge acquired from conventional 2D culture methods, scientific community has been challenged by the loss of efficacy of drugs when moved to clinical trials. The recent explosion of new 3D culture methods is paving the way to more relevant *in vitro* models mimicking the *in vivo* tumour environment (e.g. bone structure) with biological responses close to the *in vivo* context. The present review gives a brief overview of the latest advances of the 3D culture methods used for studying primary bone sarcomas.

© 2021 The Author(s). Published by Elsevier GmbH. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Contents

1. Introduction	2
2. 3D culture methods of primary bone tumours	3
2.1. 3D osteosarcoma culture models	3
2.1.1. 3D culture and drug resistance in osteosarcoma	3
2.1.2. Impact of the tumour microenvironment structure in drug resistance	3
2.1.3. Osteosarcoma cancer stem cells and 3D culture methods	5
2.1.4. Proteomic profile in osteosarcoma 3D cultures	5
2.1.5. 3D osteosarcoma culture as a novel approach to study bone mineralisation	6
2.1.6. 3D culture methods for deciphering osteosarcoma metastatic process	7
2.1.7. Combination of 2D and 3D culture methods for the study of new vessels during osteosarcoma development	7
2.1.8. 3D Ewing sarcoma culture models	7
2.1.9. Drug resistance in 3D Ewing cell cultures	7
2.1.10. Impact of tumour microenvironment in 3D Ewing cultures	7
2.2. 3D chondrosarcoma culture models	8
2.3. 3D models as tool to unravel drug resistance in chondrosarcoma	8
2.3.1. Chondrosarcoma 3D culture approaches to investigate cell adhesion, migration and cell-to-cell interactions	9

\* Corresponding authors at: Université de Nantes, Institut de Cancérologie de l'Ouest, Blvd Jacques Monod, 44805 Saint-Herblain, France.

E-mail addresses: [javier.munoz@ico.unicancer.fr](mailto:javier.munoz@ico.unicancer.fr) (J. Munoz-Garcia), [dominique.heyman@univ-nantes.fr](mailto:dominique.heyman@univ-nantes.fr) (D. Heymann).

<sup>1</sup> JMG and CJ contributed equally to the work.

<https://doi.org/10.1016/j.jbo.2021.100379>

2212-1374/© 2021 The Author(s). Published by Elsevier GmbH.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

3. Conclusion and future perspectives .....	9
Declaration of Competing Interest .....	10
References .....	10

## 1. Introduction

Bone sarcomas correspond to <0.2% of diagnosed cancers registered in the EUROCARE database and then they are considered as orphan tumours. The three main types of bone sarcomas are: osteosarcoma (OS), Ewing sarcoma (ES) and Chondrosarcoma (CS). Despite their low incidence, bone tumours are associated to high morbidity and mortality, with an important impact in children and young adult population (e.g., 80% of ES patients are under 20 years of age at diagnosis). The absence of specific symptoms at early stages of the disease leads to late diagnosis that frequently corresponds to aggressive phases that include cancer cells spreading and establishment of bone and lung metastases. Unfortunately, whether the 5-year survival rate is 50–70% for OS and ES, there is a drop around 20–30% when lung metastases are detected at the time of the initial diagnostic [1]. CS are associated with high local recurrence associated with high morbidity [2].

OS constitutes the main entity with an incidence of two-thirds of primary bone tumours and affects preferentially children and adolescents. In most of the cases, clinical treatment includes surgical procedure combined with adjuvant and neo-adjuvant poly-chemotherapies with or without radiotherapy. Unfortunately, distant recurrences (with a high predilection for the lung) frequently occur and are associated with drug resistance [2]. OS normally germinates from malignant mesenchymal cells of long bones committed in osteoblastic differentiation and are characterised by the production of an osteoid matrix by tumour cells [3]. The aetiology of the disease is explained by initial somatic mutations of p53, Rb and a BRACness signature that lead to chromosomal instabilities, complex genomic profile and high cellular heterogeneity [2,4]. Cancer stem like cells [5], tumour microenvironment (TME) including immune infiltrated cells and extracellular matrix (ECM) that modulates tumour cell adhesion and migration are also suspected to contribute to this high heterogeneity and to the acquisition of drug resistance [6,7]. Thus, due to their highly complex pathobiology and the limited access to patient samples, a better understanding of OS growth and drug development require the generation of new cell culture methods that mimic native TME of OS [8].

ES is characterized by its high aggressiveness, fatal malignancy developed in bone and extra skeletal sites and with a rapid metastatic expansion mainly in lung. ES is the second most common paediatric bone tumour affecting 3 children per million [9]. ES principally affects Caucasian patients with a slight prevalence in men than women. ES cell classically presents a round morphology, with common expression of the CD99 (MIC2) antigen and chromosomal translocation of the *EWSR1* gene to *ETS* family genes [10]. Experimental evidence suggests that ES cells may originate from undifferentiated mesenchymal stem cells (MSCs) characterised by neuroendocrine features and acquisition of *EWSR1* translocation [11,12]. In addition to conventional chemotherapies, clinical developments are focused on downstream partners of the *EWSR1/FLI1* signalling pathways [13,14]. An important feature of ES is the high resistance to chemotherapy agents, in part due to their particular MSCs origin but also to its complex TME. Reproduction of TME by 3D culture techniques results in a key progress to better understand the behaviour and drug resistance of ES.

CS compose a heterogeneous group of primary malignant tumours characterised by relative low growth ratio and the formation of hyaline cartilaginous neoplastic tissue. Depending on their malignancy, CS are classified in three grades: low-metastatic grade

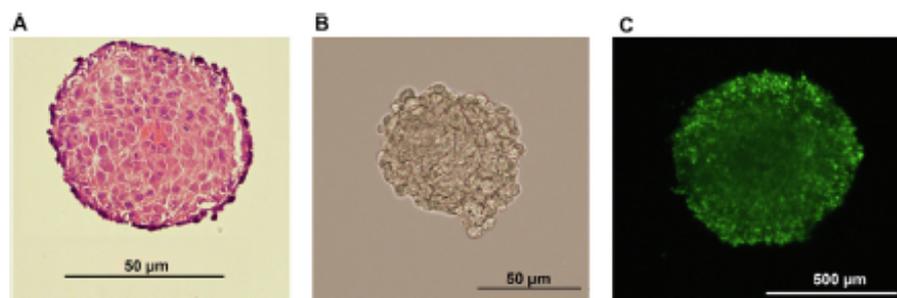
I, intermediate grade II, and high metastatic grade III [15]. CS are characterised by a high chemo- and radio-resistance mainly due to the presence of large amount of ECM and poor vascularity that restrict the diffusion of anticancer agents and slow down their effectiveness [16]. The importance of these features has motivated the scientific community to switch to 3D culture systems that can reproduce the native CS condition and have the potential to be a great tool for developing new therapies against CS.

Beside the genetic charge present in tumour initiation, TME has emerged as a key factor for tumour development and malignancy. For a better understanding of tumour biology, the scientific community has to reproduce, as close as possible, natural cell growth conditions [17]. During last decades, many technological progresses have been proposed to mimic native tumour biology. Whereas the first documented cell culture methods date from 1885 by Wilhelm Roux [18], the establishment of a true two-dimensional (2D) laboratory tissue culture system has been described by Ross Harrison at the beginning of the 20th century [19]. This event led to a scientific revolution in the understanding of cell behaviour during healthy and pathogenic situations. While 2D cell culture techniques became standards in research laboratories for a wide window of studies and fields, they do not reproduce the dynamic evolution of tumour growth and failed to mimic cell-to-cell or cell-to-microenvironment interactions. To overcome these 2D culture issues, during last decades, a variety of 3D cell culture techniques has been developed including liquid-based scaffold free methods, scaffold 3D systems and the emerging organ-on-a-chip platforms: microfluidics and bioprinting systems [20–23].

Briefly, liquid-based scaffold-free methods are based on the prevention of cell adhesion to the cell culture container surfaces (e.g., vessels, plates) by coating them with non-adherent materials such as agar or poly-hydroxyethyl methacrylate [24]. The absence of adherent surfaces promotes cell-to-cell adhesion and formation of spontaneous spheroids. Wide variety of low/non-adherent supports are commercially available nowadays. Hanging drop technique is another liquid-based scaffold free methods that allows the production of spheroids using mono- or multi-cellular (co-cultures) approach thanks to the effect of the gravity (Fig. 1) [25,26]. Low adherent supports and hanging drop methods have been also widely used to study cell organisation, embryonic development, tumour biology and tissue formation [25,27–32]. However, one of the main drawbacks of liquid-based scaffold methods is the lower reproducibility and control of the surrounding cell microenvironment.

Scaffold 3D systems consist in a structural support that favours cell adhesion, proliferation, migration, cell-to-cell interaction and signalling [33,34]. Natural scaffolds are based on molecules that are present in the ECM such as collagen, gelatine and derivatives [35,36], complex matrix (e.g., commercial Matrigel™) and hydrogels [37,38], and polysaccharides as alginate, chitosan or hyaluronic acid [39–43]. Whereas the main advantage of these natural scaffolds is their biocompatibility, their production and inter-batches variability are the main issues of these materials. To solve these problems, synthetic scaffolds characterised by high stability, reproducibility and biocompatibility have been developed [44]. The most used synthetic scaffolds are based on polyethylene glycol (PEG) polymer hydrogels [45–48].

Finally, organ-on-a-chip platforms are based on microfluidic devices or 3D bio-printed systems [49–53]. Both techniques allow



**Fig. 1. Osteosarcoma spheroid.** Representative images of OS spheroid. A) HES staining of MNNG/HOS spheroid. B) Wide-field MNNG/HOS spheroid using a Nikon Eclipse Ni microscope. C) MNNG/HOS spheroid at day 3 obtained from 20,000 cells in DMEM (Gibco®) supplemented with 1% L-glutamine plus 10% FVS using 96-well low adherent plate U-bottom (ThermoFisher), labelled with Vybrant™ DiO (ThermoFisher) and imaged in a Operetta CLS high-content analysis system (PerkinElmer).

a precise control of the TME by applying a tuneable perfusion of media that mimics blood flow and facilitates a continuous access of nutrients, oxygen and drugs [54–56]. In addition, these systems can reproduce the complexity of tissue by adding layers or compartments by co-culture of different various sets of cells in the presence of various ECM components [57–59].

In the present review, we will focus on the different 3D culture techniques recently developed for the three main bone sarcoma entities.

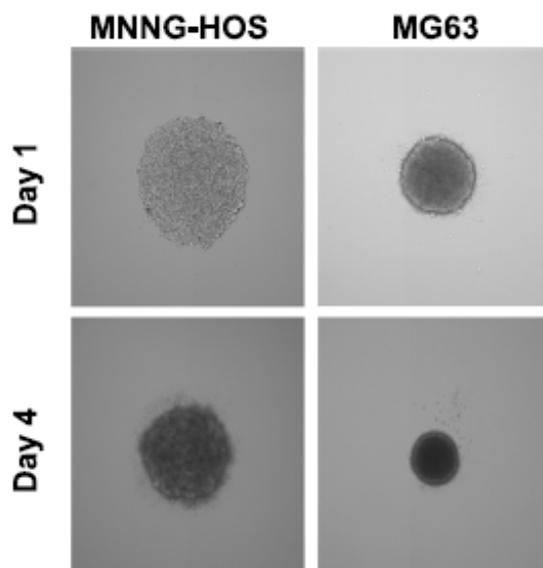
## 2. 3D culture methods of primary bone tumours

### 2.1. 3D osteosarcoma culture models

With a low 5-years survival rate and no improvement in the last 4 decades, OS is a rare and devastating oncological entity that affects mainly children and young adults. The complexity of the bone structure and surrounding TME imply that 2D monolayer culture stays far away from the organisation of natural tumour tissue and impairs the study OS development [7].

#### 2.1.1. 3D culture and drug resistance in osteosarcoma

Low attachment and hanging-drop cell culture are the most frequently employed liquid-based scaffold-free method [60] and consist in an easy 3D approach for generation of OS spheroids to study cell behaviour and drug resistance (Fig. 1 and Fig. 2) (Table 1). By using hanging-drop methodology, Rimann *et al.* demonstrated that spheroids produced from established cell lines, like SaOS2 or HOS, exhibited a totally different pattern of resistance to a panel of anti-tumour drugs compared to 2D (monolayer) culture methods [61]. Indeed, the IC50 values for doxorubicin, cisplatin, taxol, and tauro-lidine significantly increase in 3D culture, meaning that 3D cells are more resistant to those drugs than monolayer culture. Those data were consistent with the observation done in patients where treatment based in 2D dose concentrations showed a decrease of drug effectiveness compared to 2D culture [61]. Many papers appeared reinforcing the concept that 3D spheroids are really closed to real tumour behaviour to drug treatment [61–65]. Similarly, U2OS spheroids generated by ultra-low attachment methods were used to mimic tumour structures and demonstrated the potential use of the nuclear NAD synthesis enzyme nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase-1 (NMNAT1) as a target for anti-tumour drugs [66]. The expression of this enzyme increased in several tumour cell lines after exposure to DNA damaging agents as cisplatin and doxorubicin, suggesting an important role of this enzyme in tumour resistance [66].



**Fig. 2. Sarcospheres from different OS cell lines.** Representative images of OS spheroid formed from different OS cell lines depicting differences in size and morphology. MNNG-HOS and MG63 OS cells were plated at 5,000 cells/well and 2,500 cell/well respectively in low adhesion plates (Corning Costar®) coated with DMEM (Gibco®) + 10% agarose and imaged on days 1–4 using the Celigo Imaging Cytometry System (Nexcelom Bioscience).

#### 2.1.2. Impact of the tumour microenvironment structure in drug resistance

Cancer cells receive multiple signals (autocrine, juxtacrine and endocrine messages) coming from their cellular neighbours, the extracellular matrix and distant organs. By integrating all of the information, cancer cells change their behaviour, modify their metabolism and migration properties and become quiescent, or highly proliferative or resistant to drugs. TME then plays a crucial role in drug resistance [67]. Whereas hanging drop techniques have been used with success for rapidly forming tumour spheroids, this approach is far from wholly reproducing the natural TME controlling the cancer cell behaviour. 3D cell culture based on scaffold methods using natural components identified in the natural TME is one of the strategies proposed to mimic the environment of cancer cells. Interestingly, 3D scaffold are also bivalent tools not only

**Table 1**  
3D methods used in primary bone tumors.

Bone tumor	Technique	Material	Cell line	Reference
Osteosarcoma	Scaffold-free	Hanging drop and low attachment	SaOS2	61–66,83,84,86,109
			HOS	
			U2OS	
	Scaffold	Alginate beads	D17	68,72,78,83
			MG63	
			LM8	69
			MG63	
			SaOS2	71
			HOS	
			PEG	72,47,6,90–94,110
			Collagen	
			U2OS	72
			MG63	
			Agarose	73,102
			PCL	
Methylcellulose	77			
HOS				
PLA	97			
MG63				
HA	84,85,102,107			
MG63				
BCP	101,107			
O5 MSC				
Complex matrix	SaOS2	70,72,84,92		
U2OS				
	MG63			
	Microfluidic/Bioprinting			96,110
		PDMS	SaOS2	98,99,106–109
			MG63	
Ewing Sarcoma	Scaffold-free	Hanging drop and low attachment	RD-ES	112,117–119
			A673	
			SK-N-MC	
			VH-64	
			T-32	
	Scaffold	PCL	TC-71	111,113,114
			A4573	
			RD-ES	115
			MG63	
			HA	
Scaffold-free	Hanging drop and low attachment	A673	120	
		SK-N-MC		
		RD-ES		
		A763		
		SK-N-MC		
Chondrosarcoma	Scaffold-free	Hanging drop and low attachment	A673	121,122
			Primary cell lines	
			SW1353	
			CAL78	
			OUMS27	
	Scaffold	Levitation forces	CH03	127–131,133
			CH34	
			CH56	
			CH2879	
			L835	
Scaffold	Alginate	SW1353	140	
		CH28979		
		JJ012	134,135	
		SW1353		
		SW1353		
Scaffold	Collagen	SW1353	136,138	
		SW1353		
Scaffold	Titanium beads	HCS-2/8	137	
		HCS-2/8		

PEG: polyethylene glycol; PCL: poly( $\epsilon$ -caprolactone); PLA: poly(D,L-lactic acid); HA: Hydroxyapatite; BCP: biphasic calcium phosphate; PDMS: Polydimethylsiloxane

usable in *in vitro* assays but also as support of cancer cells in *in vivo* animal experiments. The use of alginate beads is a perfect example of a 3D scaffold frequently applied to the oncology field. Alginate is used firstly to encapsulate and proliferate OS cells in a 3D spheroid configuration, and secondly for studying the metastatic effect of OS cells in animal model after inoculation of encapsulated cells [68]. The drug sensitivity was compared between 2D and 3D cell culture conditions and revealed a significant higher drug resistance when cells were cultured in 3D scaffolds compared to monolayer (2D) cell cultures. The use of silk sponges was also described as 3D scaffold for the expansion of SaOS2 and U2OS cell lines, which appeared less sensitive to drug treatment (doxorubicin and cisplatin) than cell lines cultured in a 2D environment [69]. 3D SaOS2 and U2OS cell spheroids were also generated by using commercial

culture plates coated with various matrix: hyaluronic acid, collagen and adhesion proteins (Biomimesys™ matrix, from HCS Pharma, France). By using such an approach, 3D cultures differentially modulated the ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) and B1 (ABCB1, also known as Multidrug resistance protein-1, MDR1) expressions associated with the drug efflux and resistance which has not been observed in 2D environments [70]. 3D culture cells exposed to doxorubicin were characterised by a higher expression of ABCB1 implicated in the intracellular drug efflux, induced by the ERK1/2/HIF-1 pathway. Surprisingly, the increase of expression of ABCB1 was accompanied by a reduction of ABCA1 and by T-cell inactivation. ABCA1/ABCB1 ratio was then related to the chemo- and immune sensitivity of human OS. These resistances were reversed when ABCA1/ABCB1 ratio was increased

[70]. This observation suggested that the upregulation of ABCB1 transporter may induce an anti-drug and anti-immune resistance properties in OS tumours.

The physical characteristics (e.g. elasticity) of the scaffolds influence cancer cell properties. The generation of a hydrogel with a tuneable network of PEGDA and Gelatin-Methacryloyl (GelMA) enabled the control of the stiffness and adhesion properties of the substrate. The stiffness of the substrate correlated with the proliferation and progression of SaOS2 OS cells which proliferated much better when the rigidity of the substrate increased. This stiffness dependency relied in the regulation of the integrin-mediated focal adhesion signalling pathway [71]. Similarly, a recent study compared the viability of OS MG63 cells cultured in four different scaffolds (collagen, Matrigel<sup>TM</sup>, alginate and agarose) and demonstrated that their viability was also dependent on the scaffold elasticity [72]. Whereas cell adherence was similar for the different cell types in 2D models, ranking collagen as the best substrate followed by Matrigel<sup>TM</sup>, alginate and agarose, 3D cultures of OS cells were more dependent on substrate elasticity for an optimal proliferation. In this case, robust gels such as collagen and agarose are more proliferative substrates than softer hydrogels, Matrigel<sup>TM</sup> and alginate. Interestingly, even if the four substrates were able to produce *in vivo* tumour in animal model, tumour size and angiogenesis process also correlated to the elasticity of the substrate and showed higher size and micro-vessel formation in collagen and agarose than in Matrigel<sup>TM</sup> or alginate [72]. Mechanical properties of the ECM were also related to the drug resistance of cancer cells. Molina *et al.* developed a 3D culture system that allows mechanical modulation of TME by changing substrate stiffness [73]. They observed that lower stiffness induced the nuclear localisation of mechanotransduction pathways, contributing to specific drug resistance to anti insulin-like growth factor-1 and mTOR drugs [73]. By using collagen scaffold, Fallica *et al.* demonstrated that U2OS osteosarcoma cells exhibited increased resistance to the anti-proliferative drug PI103 in 3D gels than in conventional 2D cultures [74]. These authors observed that the increase of collagen concentrations augmented the resistance of OS cells to the inhibitor. This observation was in agreement with many clinical cases in which the increase of collagen levels in TME was associated to a poor patient survival [75]. Reinforcing the importance of collagen scaffold composition, Charoen *et al.* demonstrated that concentration of 3–4 mg/ml of type I-collagen gels was crucial for optimum development of OS spheroids, whereas the optimum concentration for MDA-MB-231 breast cancer spheroids was 2 mg/ml [76]. These data suggest that production of specific tumour niches depends on tissue ECM composition. Matrigel<sup>TM</sup> or agarose were replaced by methylcellulose for facilitating the development of cancer cell spheroids. Based in an *in vitro* methylcellulose scaffold model, Bai *et al.* generated spheroids from HOSS1 OS cell line and various soft-tissue sarcomas including HT1080 fibrosarcoma, RD rhabdosarcoma, SW872 liposarcoma cells. Spheroids formed in this 3D environment showed more resistant properties to doxorubicin, gemcitabine and docetaxel or X-ray radiation than those formed in 2D cultures [77].

Tumours are characterized by a high heterogeneity of cell distribution with a necrotic or apoptotic core surrounded by quiescent layer of cells followed by proliferative cells. This tumour stratification is associated with a different TME composition in each tumour region. The determination by mass spectrometry imaging (MSI) of the spatial distribution of metabolites in response to doxorubicin treatment on SaOS2 OS cells cultured in alginate compared to 2D underlined the role of the 3D environment. The combination of 3D culture and MSI techniques represent a new tool to better understand drug activities and design new therapeutic approaches [78]. In addition to its role in anti-tumour drug resistance, TME plays a role in cell accessibility for genetic manipulation. 3D mini-

erized alginate-chitosan cell encapsulation resulted in an efficient tool for gene transfection in human bone cells [79]. Polysaccharide beads facilitated gene uptake by SaOS2 cells when specific calcium phosphate and chitosan rate were used indicating that microcapsule environment composition is crucial for gene transfection in 3D bone model [79].

#### 2.1.3. Osteosarcoma cancer stem cells and 3D culture methods

OS, and other tumours, are composed by highly heterogeneous cell populations that include "Cancer Stem Cells" (CSCs) or "tumour-initiating cells" [6,81,81]. CSCs combine stem cell features with tumour characteristics as tumour initiation ability, dormancy, recurrence and metastasis [79,82]. Thus, CSCs respond differently to anti-tumour treatments than non-CSCs tumour cells by showing a more resistant drug phenotype and leading the role of treatment failure [81]. CD133 CSC spheroids were generated from the SaOS2 cell line by using a scaffold-free 3D model based [83]. The generated spheroids were viable, conserved their pluripotency, and constituted an ideal model for drug screening. CSCs enrichment from MG-63 and SaOS2 spheroids by scaffold-free method was combined with two hybrid scaffolds that mimic ECM and used to analyse the impact of ECM in OS CSCs development [84]. Hybrid scaffold was constituted by Mg-doped hydroxyapatite coupled to collagen fibres and a porous hydroxyapatite substrate. Both hybrids scaffolds resulted in stable CSCs enriched OS spheroid growth without any loss of round morphology compared to 2D. Moreover, an increase of stemness markers including OCT-4, NANOG and SOX-2 was observed that indicated that both types of hybrids scaffolds were able to mimic native environment promoting CSC stimulation [84]. Hydroxyapatite nanoparticle 3D cultures had a strong impact on the survival of OS cells under anti-tumour oxidative stress therapy [85]. Cold atmospheric plasma resulted in a potential therapy in OS by induction of oxidative stress and subsequently cell death in 2D cultures. However, when this therapy was tested in 3D, MG-63 OS cell cultures in hydroxyapatite nanoparticles were characterised by a significant decrease of cell death [85]. This property was related to 3D environment due to the nanoparticles that favoured cell scavenging and evasion from reactive oxygen and nitrogen particles. Moreover, the generated 3D TME enhanced CSCs subpopulation expansion [85]. These data suggest a relevant role of TME in the development and drug resistance of CSC on OS, and the advantage of the use of 3D culture techniques that mimic native 3D OS nature unlike 2D approaches.

#### 2.1.4. Proteomic profile in osteosarcoma 3D cultures

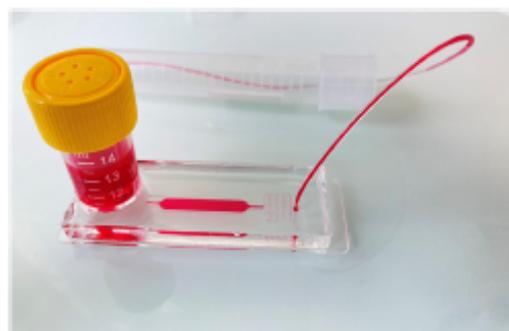
Protein expression and modification are highly impacted by nutrient availability and TME. Interestingly, the protein expression profiles significantly differ between 2D and 3D cultures. A proteomic study using spheroids produced by ultra-low attachment supports from the dog OS cell line D17 demonstrated that the development in 3D culture induces an increase of glycolysis/glucogenesis pathways, biosynthesis of amino acids and changes in carbohydrate metabolism [86]. These data were in agreement with the metabolism observed during tumour development and the generation of a hypoxic local environment. Chaperon's family, which is composed by protein folders associated to cellular stress response and cytoskeletal organization, is similarly modulated by 3D context. On the opposite manner, general protein phosphorylation is upregulated in 2D cultures compared to 3D environment, probably due to the increase in the growth rate observed in monolayer cell cultures [86]. These data suggest that, in order to better understand the proteomic profiles presented in tumours, all the previous information obtained by 2D studies must be re-evaluated in the light of the 3D culture methods close to the tumour behaviour.

### 2.1.5. 3D osteosarcoma culture as a novel approach to study bone mineralisation

OS is characterised by the production of mineralised tissue. Osteoblastic-like OS cells show an increase in the level of protein implicated in the mineralisation process (as TNAP, BMP-2 and CaSR). The faster osteogenic properties of OS cells make them an interesting tool to better understand the bone mineralisation process. While 3D culture techniques have been widely developed for mimicking TME and, subsequently, more reliable anti-cancer drugs screening, bone 3D cultures were also used to study osteogenesis biology.

Natural and synthetic scaffold gels generate a macro- and microstructural configuration similar to the trabecular bone identifying these materials as perfect supports to study bone mineralisation [86–89]. Type I collagen stands out as a great 3D scaffold for bone mineralisation in which SaOS2 cells can be expanded. Magnesium is a key cation involved in many biological activities such as metabolism, muscle contraction and bone cell function. Almost 50% of the magnesium present in the body is associated with bone tissue (hydroxyapatite crystals, HA) and influences bone-remodelling processes. By using a 3D collagen scaffold approach, Picone *et al.* showed that intracellular magnesium was incorporated at the early phase of bio-mineralisation, a process which may favour HA platelet formation and interfibrillar mineralisation [90]. The composition of culture media appeared critical similarly to the 3D environment. Indeed, a Modified Eagle's Medium resulted in a better mineralisation induced by SaOS2 than conventional medias (e.g. Dulbecco's Modified Eagle's Medium) used for this cell line [91].

The morphology of mineralised matrix produced by HOS OS cells strongly differed according the cell culture condition used (2D to 3D) [92]. While 2D cell cultures produced spheroid particles in the surrounding cell layers, in 3D culture conditions (type I collagen and poly-ion complex hydrogels) amorphous mineralised particles were observed at the matrix layers. This phenomenon produced gel turbidity that could be used as an indicator of the level of mineralisation [92–95]. These data indicate that 3D gels are interesting approaches for osteogenesis studies associated with OS development. However, structure and mechanical properties of 3D gels are crucial parameters for investigating bone mineralisation. Similarly to tumour development, the pore size of the matrix used to promote osteogenesis is a critical factor. Using bioprinting approach, Vanderburgh *et al.* showed that a 300  $\mu\text{m}$  pore size produced the optimum osteoblast differentiation and mineralisation. In addition, this pore size also favoured OS tumour growth and proliferation [96]. The distribution of pores also influences the structure of the extracellular matrix. The comparison of two types of 3D poly(D,L-lactic acid) scaffolds, one with regular pore distribution and the other with random distribution, showed that both types were adapted substrates for the attachment and proliferation of MG63 OS-derived osteoblasts. However, the random pattern, which is closer to real bone structure, induced a better distribution and organization of collagen fibres [97]. Polydimethylsiloxane (PDMS) is widely used as material to produce microfluidic devices but it can be also used as a scaffold for cell cultures [98]. A water-PDMS emulsion was used as a porous template for SaOS2 OS proliferation. Playing with different curing parameters for PDMS and pressure, Riesco *et al.* generated various grades of PDMS reticulation that allowed proper adhesion and proliferation of OS cells. Moreover, this system provides a fast and cheap way to produce scaffolds in mass [98]. As mentioned before, PDMS is the most commonly used material for microfluidic device fabrication (Fig. 3). A microfluidic chip was developed for the production of OS spheroids in mass (up to 5000) [99]. Microfluidic device was treated with a surfactant (Synperonic®) to generate a non-adherent surface that favoured the generation of MG63 spheroids



**Fig. 3. 3D Spheroid PDMS chip.** PDMS microsystem for spheroid cell culture in a 60 × 22 mm slide. Microsystem is constituted by a reservoir for media (a 15 ml Falcon tube cut at desired size) glued to the PDMS microsystem. The reservoir is connected to the cell culture chamber by an 8 mm length channel (200  $\mu\text{m}$  wide and 70  $\mu\text{m}$  high). Cell culture chamber is 4 mm wide by 20 mm long (height 200  $\mu\text{m}$ ). To slowdown media flow, a 2 cm long serpentine channel (200  $\mu\text{m}$  wide 70  $\mu\text{m}$  high) was placed after the cell chamber. Output through 1.5 mm Tygon tubing with 500  $\mu\text{m}$  internal diameter.

in a similar way as non-adherent plates. Massive production of spheroids was used to challenge spheroids to two different cellular stresses: nutrient deprivation (serum concentration) and hypoxia (HIF inhibition). 3D cultures obtained data confirmed *in vivo* observation where stress conditions favoured the increase of VEGF secretion and induction of malignancy processes [99]. This study confirmed the impact of ECM variation in tumour malignancy as well as demonstrated that microfluidic approaches represent an interesting tool for massive 3D cultures and analysis. However, it has been reported that the combination of commercial OS tumour cell lines and collagen and Matrigel™ scaffolds may not be the perfect model for 3D tissue bone engineering studies [100]. The hypoxia observed in 3D cultures using scaffolds like collagen and Matrigel™ generated less oxidative stress by tumour cells than in 2D. In addition, this oxidation can negatively impact the bone mineralisation [100]. By using non-tumour cell lines, Gamblin *et al.* generated 3D cultures to study osteoblastic and osteoclastic differentiation [101]. Based on biphasic calcium phosphate microbeads scaffolds, these authors induced the proliferation of MSCs that adhered and proliferated with abundant production of collagenous ECM. Interestingly, the system promoted the co-cultures of differentiated MSCs with osteoclasts generated from peripheral blood CD14-positive monocytes. Altogether, the system was able to mimic bone precursors behaviour and established a valid non-tumour approach to study drugs for bone healing, osteoporosis and OS biology [101]. The production of hybrid scaffolds as the combination of layers of biodegradable polymer poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) and layers of chitosan in combination with HA by electrospinning method resulted in continuous micro- and nano-fibers with high surface area and micropores that provided optimal attachment and proliferation of SaOS2 OS cells with high mineralisation activity [102]. Bioprinting methods have been also used to produce hybrid hydroxyapatite-chitosan-genipin hydrogels to analyse nanomechanical properties of generated bone tissue [103]. Bioprinter hybrid scaffolds resulted in a good structured TME that favoured 3D MG63 OS cell adhesion, culture and proliferation [103], indicating that bioprinting methods constitute interesting platforms to analyse how the composition and architecture of ECM impact bone mineralisation.

Other types of scaffold methods for 3D culture of OS cells imply the use of stirred-tank bioreactors [104]. Based on this equipment, Chen *et al.* developed a fibrous bed bioreactor with a 3D polyester

fibrous matrix that resulted in a better production of 143B OS spheroids compared to 2D cell cultures. Moreover, they gave evidence that a 3D scaffold favoured the retention of viable and non-apoptotic tumour cells together with a long-term stability [104].

#### 2.1.6. 3D culture methods for deciphering osteosarcoma metastatic process

OS cells are characterized by their ability to spread to distant tissues forming metastases (lung and bone) as carcinomas. To understand the process of cell dissemination and metastasis development, 3D bone tissue cultures were produced using a microfluidics device to mimic and analyse the “metastatic” installation in bone [105]. Hao *et al.* [106] developed a bone-on-a-chip microfluidic device in which they generated mature osteoblastic tissue using the MC3T3osteoblast precursors cell line. Cells produced a layer of heavily mineralised collagen fibres up to 85  $\mu\text{m}$  in thickness. By using this system, they analysed similarly the capability of metastatic breast cancer cell line (MDA-MB-231) to invade bone tissue. After 14 days of co-culture, cancer cells seeded and invaded the apical layer of mineralised bone tissue in an “Indian file” and formed “micro-metastases” [106]. Choudhary *et al.* developed an interesting microfluidic PDMS device that contained culture chambers in which primary human osteocytes were cultured in the presence of collagen-coated biphasic calcium phosphate microbeads for producing bone tissue in hypoxic conditions. Co-culture of conditional reprogrammed prostate cancer cell line (PCa3) with 3D osteocyte culture induced an increase of fibroblast growth factor-23, RANKL mRNA expression levels and alkaline phosphate activity by osteocytes that was associated to an increase of the mineralisation process. These results suggested that 3D microfluidic devices can be useful to better understand the metastatic process induced by primary tumours in bone tissue [107]. 3D microfluidic devices were also used to analyse the cell traction force in confined TME [108]. This device consisted in deflectable PDMS microspots included in micro-channels with different wide cross-sections. Migration test using HOS OS cells demonstrated that, in contrast to what observed in non-confining microchannels, tumour cell traction forces did not depend on myosin-II. This result showed that migration mechanisms of tumour cells during metastasis can vary depending on tissue structure, which compromises anti-metastatic drug approaches. Moreover, the traction force devices resulted in an appealing approach for new anti-metastatic drug selection screening [108].

#### 2.1.7. Combination of 2D and 3D culture methods for the study of new vessels during osteosarcoma development

An alternative to the development of complex 3D micro systems is the combination of 2D and 3D cultures. To study angiogenesis process during tumour development, 3D MG-63 OS spheroids were generated by hanging drops using Gravity PLUS plates, reaching a size of 400  $\mu\text{m}$  in diameter, and co-cultured with a HUVEC endothelial monolayer [109]. MG-63 OS spheroids produced similar ECM compared to *in vivo* tumours and acquired similar tumour architecture with proliferation cells at the periphery and quiescent cells at the centre of the spheroids. The generation of a hypoxia compartment induced the production of VEGF factor by tumour cells promoting proliferation and differentiation of HUVEC to produce vascular tubule-like structures. Using dog OS cell lines (D22 and D17) and 3D collagen gels, Massimini *et al.* demonstrated that a non-human OS model was associated with induced vasculogenic mimicry and that 17-AAg drug abolished tumour progression and micro vascular channel formation [110].

#### 2.1.8. 3D Ewing sarcoma culture models

ES is the second most common paediatric bone malignancy and the third most frequent primary bone sarcoma after OS and CS. In addition to the EWS/ETS fusion gene which is at the origin of the disease, numerous investigations highlighted the contribution of the TME in the progression and malignancy of ES [111]. Similarly to OS, scientific community has put their effort to set up new *in vitro* ES models (Table 1).

#### 2.1.9. Drug resistance in 3D Ewing cell cultures

Electrospun polymeric scaffolds based on the inert polymer PCL have become a promising 3D platform to study mechanistic and drug resistance processes in TC-71 ES cell line. TC-71 3D culture reproduced morphology, proliferation and protein expression similar to observations in human tumours. As remarked in OS models, a 3D configuration induces more resistance to drug treatment (doxorubicin) than 2D cultures [110,112]. Interestingly, the PCL 3D model revealed that the IGF-1R/mTOR signalling pathways were highly activated in ES 3D models and these pathways played a key role in the upmodulation of tumour cell adhesion, identifying IGF-1R/mTOR signalling pathways as new potential targets for drug treatment in ES [111]. Similarly, Santoro *et al.* emphasized the role of IGF1/IGF-1R pathway and biomechanical TME stimulation in drug resistance by using similar 3D models [113]. These data are in agreement with the recent study published by Molina *et al.* [114]. Indeed, these authors demonstrated that 3D TME favoured the downregulation of IGF-1R via mTOR pathway, which was accompanied by a reduction of the clathrin-dependent nuclear localisation and transcription activity of IGF-1R [114]. TC-71 3D culture was exposed to different shear stresses close to those observed in bone microenvironment in a flow perfusion bioreactor. Under shear stress, 3D ES cells enhanced cell tumour proliferation and induced an increase of IGF1 pathway compared to 2D cultures. Besides, the increase of IGF1 levels was associated to the resistance to dalotuzumab (an inhibitor of IGF1 receptor) and the downregulation of the c-KIT and HER2 oncoproteins [113]. These data suggested that biomechanical forces impacted the progression and malignancy of ES cells [113]. When ES spheroids were grown in a 3D mimic bone tissue, there was an increase in ERK1/2 phosphorylation and RUNX2 protein levels associated to drug resistance that was not observed when the same cells were cultured in 2D [115]. Interestingly, an increase of RUNX2 level was similarly observed in patients suffering from ES [115]. All those data suggest that ECM displays a key role in ES drug resistance by induction of specific mechanotransduction signalling pathways including RUNX2.

#### 2.1.10. Impact of tumour microenvironment in 3D Ewing cultures

ES are characterised by a rapid development of multidrug resistance due to the overexpression of Multidrug resistance associated protein-1 (MRP1) and ABCB1 [116]. Similarly to OS, the drug resistance of ES cells was also related to a set of stem cells with tumour-initiating properties with a development dependent of TME [116]. Supporting this idea, ES spheroids produced by ultra-low attachment method under serum-free conditions failed to generate tumour-initiating cells [117]. Although ES cells (VH-64, TC-32, TC-71 and A4573) form spheroids in serum-free media with a diameter ratio of 200  $\mu\text{m}$  and with phenotypes similar to 2D cultures, none of them was able to self-renew or expand in a clonogenic manner indicating that TME is a key factor for ES enrichment [117]. Reinforcing the role of TME in ES development, Villasante *et al.* developed an interesting 3D model based on the combination of an engineered bone tissue with spheroids produced from different ES cell types (RD-ES, SK-N-MC and EWS-GFP) [118]. Bone tissue was generated from induced osteogenic differentiation of human MSCs in a native bone ECM, whereas ES spheroids were formed thanks to the intrinsic nature of ES cells to generate cell

aggregates after long period of culture (one week at 37 °C in Eagle's Minimum Essential Medium supplemented with 10% Hyclone FBV [119]). The co-culture of these ES spheroids in the tissue bone matrix recapitulated the tumour behaviour, including the re-expression of focal adhesion and related cancer genes, generation of a hypoxic and glycolytic phenotypes and development of angiogenesis potential [118]. This study pointed out the requirement of specific niche configuration for proper development of ES. Reproduction of hypoxic conditions is indeed necessary to better understand how tumours develop angiogenic mechanism. Agar coated plates were used to induce A673 ES spheroids that were moved to a hypoxia chamber for analysing the functional relationship between hypoxia, spheroid cell distribution and DNA damage response [120]. Under hypoxic conditions, A673 ES spheroids displayed a stratification of cellular population from necrotic cells at the nucleus of the spheroids to proliferating cells located at their surface. Moreover, cells localized at the nuclear and perinuclear zone of the spheroids were characterised by an increase of  $\gamma$ -H2AX via the ATM DNA repair pathway, indicating that this approach can be used for anti-ATM drug development in ES [120]. Recently, a new approach was described for encapsulation in alginate spheres of ES cells isolated from patient derived xenografts without losing their phenotype [121]. While ES primary cultures were maintained for at least one month, cells at the core of spheroids did not undergo to hypoxia which is a key step of tumour angiogenesis. That could be due to the limitations in spheroid size by the alginate beads tested (<200  $\mu$ m), as hypoxia has been observed when spheroids reach a size over 400  $\mu$ m [122]. Overall, this method has an interesting potential as drug screening platform and can be easily implemented for hypoxia studies. In addition, encapsulation of different cell types in alginate beads can be a useful tool for cell-to-cell interactions in ES.

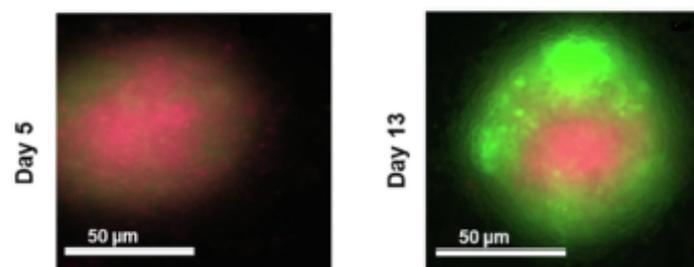
### 2.2. 3D chondrosarcoma culture models

CS is the second most frequent bone cancer characterised by the production of malignant cartilaginous matrix [122,124]. Surgery is the only effective medical treatment as CS are characterised by a high resistance to chemo- and radiotherapy. However, the mechanisms that control and regulate CS differentiation are still not well defined. MSCs can undergo into chondrogenic differentiation and have been used to understand the gene expression that determine 3D chondrogenic mechanism [125]. Chondrogenic differentiation of MSCs was associated to an increase of *SERPINA1* and *SERPINA3* mRNA expression. Moreover, secretion of *SERPINA-1* correlated with chondrogenesis and dedifferentiation during chondrocyte expansion, suggesting that *SERPINA1* could be considered as a marker of chondrocyte differentiation [125]. Similarly, MSCs were used for studying chondrocyte differentiation in spheroids and simultaneous gene expression profiles to determine genes implied in pre-chondrogenic and chondrogenic phenotype compared to tumour samples [126]. Comparative gene analyses allowed the identification of two clusters that mainly include ECM components, remodelling matrix enzymes and few growth factors useful to predict the clinical behaviour of CS subtypes [126].

### 2.3. 3D models as tool to unravel drug resistance in chondrosarcoma

As mentioned above, CS are resistant to conventional chemotherapies. CS cell resistance can be explained in part by the structure of the tissue and its dense hyalin ECM composition, indicating that 3D models will become crucial tools to better understand the mechanism underlying CS drug resistance (Table 1). Comparison study between 2D and 3D chondrogenic spheroids from different origins (SW1353, CAL78 and OUMS27) and new established CS cell line from primary tumour biopsy (CH03, CH34

and CH56) showed that 3D CS spheroids were more resistant to chemotherapeutic drugs (Doxorubicin and Mafosfamide) than 2D cultures [127]. As shown by RT-qPCR, these cell lines cultured in 2D cells lost expression of several genes (*COL2A1*, *COMP*, *ACAN*) implicated in cartilage development that was restored in 3D cultures. Moreover, the capacity of each cell type to produce cartilaginous matrix was directly related to its drug resistance [127]. These data suggested a direct functional relationship between cartilaginous matrix composition and chemoresistance. Similarly, spheroids produced by CH2879, OUMS27 and L835 cell lines were used to determine the mechanism involved in resistance to cisplatin and doxorubicin [128]. 3D spheroids were generated by differentiation of cell lines after long period of culture (6 weeks in chondrogenic medium, see [129]) and exhibited CS phenotype. Exposure to chemotherapy agents highly activated the multi-drug resistance pump (*ABCB1*) in all CS 3D spheroids. Inhibition of the anti-apoptotic *BCL-2* family members by specific drug (*ABT-737*) resulted in a sensitization of 3D CS to doxorubicin. These results indicated that tumour drug resistance does not rely only on ECM composition and that other mechanisms must be implied and be considered as potential targets for development of new CS therapies. Taken together, these data demonstrated that the mimicking of the cell behaviour and ECM of CS is the added value of 3D cultures. As discussed for OS, non-adherent surface methods can be used for obtaining multicellular tumour spheroids. Combination of non-adherent plates and 0.5% methylcellulose generated CS spheroids from the HEMC-SS cell line [130]. HEMC-SS spheroids developed CS tumour features as proliferative cell population at the periphery of a hypoxic and apoptotic core, with ECM rich in glycosaminoglycans and VEGF excretion (Fig. 4). Moreover, this model recapitulated the drug resistance phenotype observed in CS tumour for classical chemotherapy agents [130]. While still far for native tumour environment, the absence of complexity to generate this 3D system and its close features to the *in vivo* tumours make it a convincing model for massive drug screening. In this way, HEMC-SS spheroid model was used to evaluate the effect of new hypoxia-activated pro-drugs that target the rich proteoglycan ECM of CS [131]. This study showed that quaternary ammonium, which is characterised by a positive charge that interacts strongly with the negative charges present in the proteoglycans [132], could be used as an adjuvant for CS drug targeting [131]. Generation of CS 3D cultures by similar hanging-drop methods showed the potential of the ionophore salinomycin (SAL) as a new anti-CS drug [133]. SAL resulted in a strong cytotoxic effect in both 2D and 3D SW1353 (grade II) CS model by inducing cellular apoptosis via caspase activation [133]. Another approach to produce 3D CS system consists in the use of natural or synthetic material that can serve as substrates for the formation of tumour mass cells in cartilage or chondrosarcoma niches. Alginate hydrogels were used to analyse the invasion and drug resistance of CS models [134]. Compared to other biomaterials as collagen and Matrigel™, alginate is characterised by an inert and stable composition, which is translated in a more reproducible method to generate beads for encapsulation. Alginate encapsulated CH2879, J012 and SW1353 CS cell lines, compared to a 2D culture, were characterised by a long-term lifespan with generation of a hyaline-like cell matrix and demonstrated that 3D cultures recapitulated cell matrix gene expression. Interestingly, CH2879 cell line displayed an evasion phenotype from the beads compared to the other cell line models. This was somehow in coherence with the grade of malignancy III of this cell line whereas the other two are grade II. This data suggests that alginate beads are useful to analyse CS cell invasion properties. Thus, it can be combined with drug screening as alginate beads CS 3D model summed up the characteristic drug resistance phenotype of CS cell lines [134]. In agreement with this result and by using same methodology, Palubeckaite et al. showed that



**Fig. 4.** Cell subpopulation in an OS spheroid. Spheroids are characterised by a continuum subset of cells that goes from apoptotic or bone-like MSC non-dividing cells (in red) to a peripheral proliferative subset of cells (green cells). 10,000 GFP-MNNG/HOS cells were seeded into a 96-multiwells low-attachment plate and cultured for 13 days. Pictures showed population evolution from day 5 to day 13. GFP expressing MNNG/HOS osteosarcoma cells stained with DiD (ThermoFisher) to show the retention of DiD by a non-proliferating subpopulation of the cells in the formed spheroid and imaged using fluorescent microscopy. Scale bar corresponds to 50  $\mu\text{m}$ . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

CS 3D spheroids reproduced similar phenotype that *in vivo* CS with production of an ECM enriched in collagen II and resistance to chemotherapeutic agents as doxorubicin, cisplatin, temozolomide and YM-155 [135].

CS are resistant to radiotherapy. Hamdi *et al.* developed a 3D approach to analyse the impact of linear energy transfer ionizing radiation (LET) in CS [136]. Due to its relative photon radio-resistance, metastatic potential and cartilage phenotype, intermediate-grade II SW1353 CS cell line was used as a model. 3D culture was performed by using a collagen scaffold and hypoxic conditions (2% of  $\text{O}_2$ ) to mimic *in vivo* cartilage environment. Exposure to low and high LET radiation showed that 3D cultures resulted in a more resistant phenotype with a delayed response of DNA repair mechanisms (evaluated by H2AX expression post radiation) than 2D cultures, where cell were grown in monolayer conditions and normoxia (20% oxygen). The main difference between culture methods relied in the microenvironment conditions, which implied that the microenvironment played a key role in the radiation resistance of CS and should be considered when determining the depth-dose profile in radiation therapy of SC [136].

### 2.3.1. Chondrosarcoma 3D culture approaches to investigate cell adhesion, migration and cell-to-cell interactions

3D CS cultures were used to determine the impact of TME charges during cell adhesion [137]. Titanium beads from 400 to 500  $\mu\text{m}$  were modified by deposition of polyelectrolyte multilayer film that conferred a positive or negative surface charge. In the presence of negative charges, human HCS-2/8 CS cells exhibited cytoplasmic stress fibres that were totally absent when positive charged TME were tested, indicating that anionic charges affected cytoskeleton organisation. Moreover, anionic but not cationic surfaces promoted two modes of pseudopod formation by HCS-2/8 cells, in a random progression and as a "cell recognition signal". This phenomenon was associated with a cellular mechanism to optimize the anchoring process. Interestingly, cells developed pseudopods on cationic surfaces when cells were cultured in the presence of conditioned medium obtained from an anionic culture, suggesting that this process was regulated by an exocytotic mechanism. This mechanism was linked to the MAPK ERK1/2 pathways as phosphorylation levels were increased in the presence of anionic charges and reduced when cationic surfaces were assessed [137]. Overall, these studies suggested that ECM has a relevant role in CS cell adhesion and migration.

As described for OS, direct or indirect cell–cell interactions between CS cells and cells of the local microenvironment can be analysed by combination of 3D and 2D cultures. In a recent study,

Minopoli *et al.* analysed the contribution of pro-tumoral M2 macrophages to CS development [138]. Primary CS cells were isolated from patient biopsies and cultured by hanging drop methods to produce 3D spheroids and then co-cultured in collagen/fibroblast matrix with blood isolated monocytes. The size of CS spheroids increased in the presence of monocytes, probably due to an increase of CS cell invasive capability induced by monocyte factors. And reciprocally, CS cells induced monocyte differentiation into a pro-tumoral M2 phenotype. These observations indicated a crosstalk between CS cells and macrophages through soluble mediators [138]. The induction of CS proliferation by macrophages was inhibited by the addition of urokinase receptor (uPAR)-derived synthetic peptide RI-3 which was known to reduce the monocyte migration [139]. In this context, RI-3 could potentially avoid the recruitment of monocytes to CS niches and reduce proliferation and angiogenic properties of CS tumour [138].

Recently, an innovative method was developed to assemble 3D CS spheroids by levitational forces by using low doses of gadobutrol salt [140]. As biological tissues are considered to be diamagnetic, they can be levitated when paramagnetic medium is used. Paramagnetic ions of Gadolinium(III) ( $\text{Gd}^{3+}$ ) have been widely used as a contrast agent but are characterised by cytotoxicity at high concentrations and lower concentration of  $\text{Gd}^{3+}$  did not allow cell levitation. However, by using high magnetic fields, Parfeno *et al.* induced SW1353 CS spheroid levitational bio assembly in the presence of lower doses of gadobutrol (0.8 mM). The study revealed minimal cytotoxicity by the magnetic field and opens a new area in the domain of microgravity and tumour biology [140]. In the meantime, further studies may be needed to determine if high magnetic fields have an impact in cell behaviour, genomic and proteomic expression pattern.

## 3. Conclusion and future perspectives

Primary bone tumour progression and metastasis rely on the particular combination of bone MSC differentiation and physiological, structural, biochemical TME interactions. 2D cultures were considered for a long time as a valid approach for improving the knowledge in tumour biology. Many studies gave evidence that 2D cultures did not reflect the real nature of tumours, as many treatments that were effective in 2D failed in clinical trials. In this context, development of 3D culture approaches that mimic TME is a new perspective. In particular, the use of natural materials already presents in the bone ECM or synthetic materials as scaffolds for 3D bone culture generation demonstrates to be promising approaches for the study of tumour invasion, metastasis, angiogenesis processes and anti-tumour drug development. Moreover, the

development of novel technologies in 3D cultures as microfluidics and bioprinting that allow the generation of customizable 3D systems constitute a fully scientific revolution. These technologies can be combined with other 3D techniques and allow the creation of a fully controlled TME that reproduces the native configuration of bone tumours, including cell-to-cell or tissue interactions, cell adhesion, proliferation and migration, ECM structure and composition, physiology parameters as hypoxia, shear stress and mechanical forces. This 3D technological revolution will be an excellent opportunity for the identification of new bone therapeutic targets and drug discovery in bone sarcoma field.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### References

- [1] J.L. Ferguson, S.P. Turner, Bone cancer: diagnosis and treatment principles, *Am. Fam. Phys.* 98 (2018) 205–213, PMID: 30215968.
- [2] H.K. Brown, K. Schiavone, F. Gouin, M.F. Heymann, D. Heymann, Biology of bone sarcomas and new therapeutic developments, *Calcif Tissue Int.* 102 (2018) 174–195, <https://doi.org/10.1007/s00223-017-0372-2>.
- [3] D.D. Moore, H.H. Luu, Osteosarcoma, *Cancer Treat Res.* 162 (2014) 65–92, [https://doi.org/10.1007/978-3-319-07323-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-07323-1_4).
- [4] M. Kovac, C. Blattmann, S. Ribi, J. Smida, N.S. Mueller, F. Engert, F. Castro-Giner, J. Weschenfeldt, M. Kovacova, A. Krieg, D. Andreou, P.U. Tunn, H.R. Dürr, H. Rech, K.D. Schaser, I. Melcher, S. Burdach, A. Kulozik, K. Specht, K. Heinemann, S. Fulda, S. Bielack, G. Jundt, L.T. Tomlinson, J.O. Korbel, M. Nathrath, D. Baumhoer, Exome sequencing of osteosarcoma reveals mutation signatures reminiscent of BRCA deficiency, *Nat. Commun.* 6 (2015) 8940, <https://doi.org/10.1038/ncomms8940>.
- [5] H.K. Brown, M. Tellez-Gabriel, D. Heymann, Cancer stem cells in osteosarcoma, *Cancer Lett.* 386 (2017) 189–195, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.11.019>.
- [6] M.F. Heymann, F. Lézor, D. Heymann, The contribution of immune infiltrates and the local microenvironment in the pathogenesis of osteosarcoma, *Cell Immunol.* 343 (2019), <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.11.001>.
- [7] C. Yang, Y. Tian, F. Zhao, Z. Chen, P. Su, Y. Li, A. Qian, Bone microenvironment and osteosarcoma metastasis, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 6985, <https://doi.org/10.3390/ijms21196985>.
- [8] J. Cui, D. Dean, F.J. Hornicek, Z. Chen, Z. Duan, The role of extracellular matrix in osteosarcoma progression and metastasis, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 39 (2020) 178, <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01685-w>.
- [9] N.J. Balamuth, R.B. Womer, Ewing's sarcoma, *Lancet Oncol.* 11 (2010) 184–192, [https://doi.org/10.1016/S1473-0745\(09\)70286-4](https://doi.org/10.1016/S1473-0745(09)70286-4).
- [10] S. Renzi, N.D. Anderson, N. Light, A. Gupta, Ewing-like sarcoma: an emerging family of round cell sarcomas, *J. Cell Physiol.* 234 (2019) 7999–8007, <https://doi.org/10.1002/jcp.27558>.
- [11] F. Tirode, K. Laid-Duval, A. Prieur, B. Delorme, P. Charbord, O. Delattre, Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors, *Cancer Cell.* 11 (2007) 421–429, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.02.027>.
- [12] R. Todorova, Ewing's sarcoma cancer stem cell targeted therapy, *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 9 (2014) 46–62, <https://doi.org/10.2174/157488808666131203123125>.
- [13] S.E. Lamhamedi-Cherradi, M. Santoro, V. Ramanamorthy, B.A. Menegiz, G. Bartholomeusz, L.R. Iles, H.M. Amin, J.A. Livingston, A.G. Mills, J.A. Ludwig, 3D tissue-engineered model of Ewing's sarcoma, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 79–80 (2014) 155–171, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.07.012>.
- [14] H. Yu, Y. Ge, L. Guo, L. Huang, Potential approaches to the treatment of Ewing's sarcoma, *Oncotarget* 8 (2017) 5523–5539, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12566>.
- [15] W.A. Chow, Chondrosarcoma: biology, genetics, and epigenetics, *P1000Res.* 7 (2018) 1826, <https://doi.org/10.12688/1000research.15953.1>.
- [16] B. Meyr, S. Espenel, J.B. Guy, C. Rancoule, A. Vallard, M.T. Aloy, C. Rodriguez-Lafresse, N. Magné, Biological aspects of chondrosarcoma: leaps and hurdles, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 123 (2018) 32–36, <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.03.008>.
- [17] A.B. Shupp, A.D. Kolb, K.M. Bussard, Novel techniques to study the bone-tumor microenvironment, *Adv. Exp. Med. Biol.* 1225 (2020) 1–18, [https://doi.org/10.1007/978-3-030-35727-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-35727-6_1).
- [18] W. Roux, Beiträge zur Entwicklungsmechanik des Embryo, *Z. Biol.* 21 (1885) 411.
- [19] R.G. Harrison, The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement, *J. Exp. Zool.* 142 (1910) 5–73.
- [20] Z. Kolekova, 3D cell culture: an introduction, *Methods Mol. Biol.* 1612 (2017) 1–11, [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7021-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7021-6_1).
- [21] A.M. Sitarski, H. Fairfield, C. Falank, M.R. Reagan, 3d tissue engineered in vitro models of cancer in bone, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 4 (2018) 324–336, <https://doi.org/10.1021/acsbomater.7b00097>.
- [22] H. Qiao, T. Tang, Engineering 3D approaches to model the dynamic microenvironments of cancer bone metastasis, *Bone Res.* 6 (2018) 3, <https://doi.org/10.1038/s41413-018-0008-9>.
- [23] N. Chaichareonudomrung, P. Kunhorn, P. Noisa, Three-dimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling, *World J. Stem Cells* 11 (2019) 1065–1083, <https://doi.org/10.4252/wjscv11.i12.1065>.
- [24] A. De Luca, L. Raimondi, F. Salamanna, V. Carina, V. Costa, D. Bellavia, R. Alessandro, M. Fini, G. Giavaresi, Relevance of 3d culture systems to study osteosarcoma environment, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 37 (2018) 2, <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0663-6>.
- [25] J.M. Kdm, N.E. Timmins, C.J. Brown, M. Fussenegger, L.K. Nielsen, Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types, *Biotechnol. Bioeng.* 83 (2) (2003) 173–180, [https://doi.org/10.1002/\(ISSN\)1097-029010.1002/bit.v83.210.1002/bit.10655](https://doi.org/10.1002/(ISSN)1097-029010.1002/bit.v83.210.1002/bit.10655).
- [26] R. Foty, A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids, *J. Vis. Exp.* 51 (2011) 2720, <https://doi.org/10.3791/2720>.
- [27] S.W. Potter, J.E. Morris, Development of mouse embryos in hanging drop culture, *Anat. Rec.* 211 (1985) 48–56, <https://doi.org/10.1002/ar.1.092110109>.
- [28] B.H. Reed, S.C. McMillan, R. Chaudhary, The preparation of Drosophila embryos for live-imaging using the hanging drop protocol, *J. Vis. Exp.* 25 (2009) 1206, <https://doi.org/10.3791/1206>.
- [29] K. Archacka, M. Pozzobon, A. Repele, C.A. Rossi, M. Campanella, P. De Coppi, Culturing muscle fibres in hanging drop: a novel approach to solve an old problem, *Biol. Cell* 106 (2014) 72–82, <https://doi.org/10.1111/boc.201300028>.
- [30] S. Wang, X. Wang, J. Boone, J. Wie, K.P. Yip, J. Zhang, L. Wang, R. Liu, Application of hanging drop technique for kidney tissue culture, *Kidney Blood Press Res.* 42 (2017) 220–231, <https://doi.org/10.1159/000476018>.
- [31] M. Panek, M. Grabacka, M. Pierzchalska, The formation of intestinal organoids in a hanging drop culture, *Cytotechnology* 70 (2018) 1085–1095, <https://doi.org/10.1007/s10616-018-0194-8>.
- [32] S.W. Huang, S.C. Tzeng, J.K. Chen, J.S. Sun, F.H. Lin, A dynamic hanging-drop system for mesenchymal stem cell culture, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 4298, <https://doi.org/10.3390/ijms21124298>.
- [33] E. Carletti, A. Motta, C. Migliaresi, Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture, *Methods Mol. Biol.* 695 (2011) 17–39, [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-984-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-984-0_2).
- [34] A. Kamatar, G. Gunay, H. Acar, Natural and synthetic biomaterials for engineering multicellular tumor spheroids, *Polymers (Basel)* 12 (2020) 2506, <https://doi.org/10.3390/polym12112506>.
- [35] A.K. Kureshi, A. Afoke, S. Wohler, S. Barker, R.A. Brown, 3D culture model of fibroblast-mediated collagen creep to identify abnormal cell behaviour, *Biomech Model Mechanobiol.* 14 (2015) 1255–1263, <https://doi.org/10.1007/s10237-015-0672-2>.
- [36] A. Shahin-Shamsabadi, P.R. Selvaganapathy, A rapid biofabrication technique for self-assembled collagen-based multicellular and heterogeneous 3D tissue constructs, *Acta Biomater.* 92 (2019) 172–183, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.024>.
- [37] H.K. Kleinman, G.R. Martin, Matrigel: basement membrane matrix with biological activity, *Semin. Cancer Biol.* 15 (2005) 378–386, <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.05.004>.
- [38] S. Aoki, T. Takezawa, H. Sugihara, S. Toda, Progress in cell culture systems for pathological research, *Pathol. Int.* 66 (2016) 554–562, <https://doi.org/10.1111/pin.12443>.
- [39] T. Andersen, P. Auk-Emblem, M. Dornish, 3D cell culture in alginate hydrogels, *Microarrays (Basel)* 4 (2015) 33–61, <https://doi.org/10.3390/microarrays4020133>.
- [40] S. Fujita, Y. Wakuda, M. Matsumura, S.I. Suye, Geometrically customizable alginate hydrogel nanofibers for cell culture platforms, *J. Mater. Chem. B* 7 (2019) 6556–6563, <https://doi.org/10.1039/c9tb01353a>.
- [41] K. Xu, K. Ganapathy, T. Andl, Z. Wang, J.A. Copland, R. Chakrabarti, S.J. Horczyk, 3D porous chitosan-alginate scaffold stiffness promotes differential responses in prostate cancer cell lines, *Biomaterials* 217 (2019) 119311, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119311>.
- [42] F. Gao, J. Li, L. Wang, D. Zhang, J. Zhang, F. Guan, M. Yao, Dual-enzymatically crosslinked hyaluronic acid hydrogel as a long-time 3D stem cell culture system, *Biomed. Mater.* 15 (2020) 045013, <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ab712e>.
- [43] P. Maleki Dana, J. Hallajzadeh, Z. Asemi, M.A. Mansournia, B. Yousefi, Chitosan applications in studying and managing osteosarcoma, *Int. J. Biol. Macromol.* 169 (2021) 321–329, <https://doi.org/10.1016/j.ijb.2020.12.058>.
- [44] E.A. Aisenbrey, W.L. Murphy, Synthetic alternatives to Matrigel, *Nat. Rev. Mater.* 5 (2020) 539–551, <https://doi.org/10.1038/s41578-020-0199-8>.
- [45] M.H. Park, H.J. Moon, J.H. Park, U.P. Shinde, Y. Ko, B. Jeong, PEG-Poly(L-alanine) thermogel as a 3D scaffold of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells, *Macromol. Biosci.* 15 (2015) 464–472, <https://doi.org/10.1002/mabi.201400426>.
- [46] H. Song, G. Yang, P. Huang, D. Kong, W. Wang, Self-assembled PEG-poly(L-valine) hydrogels as promising 3D cell culture scaffolds, *J. Mater. Chem. B* 5 (2017) 1724–1733, <https://doi.org/10.1039/c6tb02969h>.
- [47] S. Pradhan, I. Hassani, W.J. Seeto, E.A. Lipke, PEG-fibrinogen hydrogels for three-dimensional breast cancer cell culture, *J. Biomed. Mater. Res. A* 105 (2017) 236–252, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35899>.

- [48] Y. Wang, X. Cao, M. Ma, W. Lu, B. Zhang, Y. Guo, A GelMA-PEGDA-nHA composite hydrogel for bone tissue engineering, *Materials (Basel)* 13 (2020) 3735, <https://doi.org/10.3390/ma13173735>.
- [49] S.N. Bhasia, D.E. Ingber, Microfluidic organs-on-chips, *Nat. Biotechnol.* 32 (2014) 760–772, <https://doi.org/10.1038/nbt.2989>.
- [50] M. Mehling, S. Tay, Microfluidic cell culture, *Curr. Opin. Biotechnol.* 25 (2014) 95–102, <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.10.005>.
- [51] B. Byambaa, N. Annabi, K. Yue, G. Trujillo-de Santiago, M.M. Alvarez, W. Jia, M. Kazemzadeh-Narbat, S.R. Shin, A. Tamayol, A. Khademhosseini, Bioprinted osteogenic and vasculogenic patterns for engineering 3D bone tissue, *Adv. Healthc. Mater.* 6 (2017), <https://doi.org/10.1002/adhm.201700015>.
- [52] R. Mittal, F.W. Woo, C.S. Castro, M.A. Cohen, J. Karanxha, J. Mittal, T. Chhibber, V.M. Jhaveri, Organ-on-chip models: implications in drug discovery and clinical applications, *J. Cell Physiol.* 234 (2019) 8352–8380, <https://doi.org/10.1002/jcp.27729>.
- [53] A.D. Suarez-Matinez, M. Sole-Gras, S.S. Dykes, Z.R. Wakefield, K. Bauer, D. Majbour, A. Bundy, C. Pampo, M.E. Burrow, D.W. Siemann, Y. Huang, W.L. Murfee, Bioprinting on live tissue for investigating cancer cell dynamics, *Tissue Eng. Part A* (2020), <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2020.0190>, Online ahead of print.
- [54] M.D. Brennan, M.J. Rexius-Hall, L.J. Elgass, D.T. Eddington, Oxygen control with microfluidics, *Lab Chip* 14 (2014) 4305–4318, <https://doi.org/10.1039/c4lc00853g>.
- [55] J. Ahn, J. Lim, N. Jusoh, J. Lee, T.E. Park, Y. Kim, J. Kim, N.J. Jeon, 3D microfluidic bone tumor microenvironment comprised of hydroxyapatite/fibrin composite, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7 (2019) 168, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00168>.
- [56] I. Denyatnik, M. Krasner, I. Prolov, M. Ronen, O. Guy, D. Wasserman, A. Tzur, D. Avrahami, E. Barbin-Michaely, D. Gerber, An integrated microfluidics approach for personalized cancer drug sensitivity and resistance assay, *Adv. Biosci.* 3 (2019) e1900001, <https://doi.org/10.1002/adbi.201900001>.
- [57] S. Bersini, J.S. Jeon, G. Dubini, C. Arrigoni, S. Chung, J.L. Charest, M. Moretti, R. D. Kamm, A microfluidic 3D in vitro model for specificity of breast cancer metastasis to bone, *Biomaterials* 35 (2014) 2454–2461, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.050>.
- [58] T. Almada, S. Al-Sahaf, I.M. Brook, K. Khoshroo, M. Rasoulihoroujeni, F. Bahimpour, M. Tahriri, E. Dashtimoghadam, R. Bolt, L. Tayebi, K. Mohamadzadeh, 3D printed tissue engineered model for bone invasion of oral cancer, *Tissue Cell* 52 (2018) 71–77, <https://doi.org/10.1016/j.tice.2018.03.009>.
- [59] N.M. Wragg, D. Mosqueira, L. Blokpeel-Ferreras, A. Capel, D.J. Player, N.R.W. Martin, Y. Liu, M.P. Lewis, Development of a 3D tissue-engineered skeletal muscle and bone co-culture system, *Biotechnol. J.* 15 (2020) e1900106, <https://doi.org/10.1002/biot.201900106>.
- [60] X. Liu, H. Lin, J. Song, T. Zhang, X. Wang, X. Huang, C. Zheng, A Novel SimpleDrop Chip for 3D Spheroid Formation and Anti-Cancer Drug Assay, *Micromachines (Basel)* 12 (6) (2021) 681, <https://doi.org/10.3390/mi12060681>.
- [61] M. Rimmann, S. Latenser, A. Gvozdenovic, R. Muff, B. Fuchs, J.M. Kelm, U. Graf-Hausner, An in vitro osteosarcoma 3D microtissue model for drug development, *J. Biotechnol.* 189 (2014) 129–135, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.09.005>.
- [62] N. Baek, O.W. Seo, M. Kim, J. Hulme, S.S. An, Monitoring the effects of doxorubicin on 3D-spheroid tumor cells in real-time, *Oncol. Targets Ther.* 9 (2016) 7207–7218, <https://doi.org/10.2147/OTT.S12566>.
- [63] I.E. León, J.F. Cadavid-Vargas, A. Resasco, F. Maschi, M.A. Ayala, C. Carbone, S. B. Etcheberry, In vitro and in vivo antitumor effects of the VO-chrysin complex on a new three-dimensional osteosarcoma spheroids model and a xenograft tumor in mice, *J. Biol. Inorg. Chem.* 21 (2016) 1009–1020, <https://doi.org/10.1007/s00775-016-1397-0>.
- [64] P. Thanindratam, X. Li, D.C. Dean, S.D. Nelson, F.J. Hornicek, Z. Duan, Establishment and characterization of a recurrent osteosarcoma cell line: OSA 1777, *J. Orthop. Res.* 38 (2020) 902–910, <https://doi.org/10.1002/jor.24528>.
- [65] S. Ienna, C. Bellotti, S. Duchi, E. Martella, M. Columbaro, B. Dozza, M. Balestri, A. Guerrini, G. Sotgiu, T. Prioni, L. Cevolani, G. Varchi, M. Ferrari, D.M. Donat, E. Lucarelli, Mesenchymal stromal cells mediated delivery of phototoxic nanoparticles inhibits osteosarcoma growth in vitro and in a murine in vivo ectopic model, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 39 (2020) 40, <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01548-4>.
- [66] A. Kiss, A.P. Ráduy, Z. Regdon, Z. Polgár, S. Tarapesák, I. Sturmiolo, T. El-Hamoly, L. Virág, C. Hegedüs, Targeting Nuclear NAD<sup>+</sup> Synthesis Inhibits DNA Repair, Impairs Metabolic Adaptation and Increases Chemoresensitivity of U-205 Osteosarcoma Cells, *Cancers (Basel)* 12 (2020) 1180, <https://doi.org/10.3390/cancers12051180>.
- [67] P.A. Netti, D.A. Beik, M.A. Swartz, A.J. Grodzinsky, R.K. Jain, Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors, *Cancer Res.* 60 (2000) 2497–2503.
- [68] K. Akeda, A. Nishimura, H. Satonaka, K. Shintani, K. Kusuzaki, A. Matsumine, Y. Kasai, K. Masuda, A. Uchida, Three-dimensional alginate spheroid culture system of murine osteosarcoma, *Oncol. Rep.* 22 (2009) 997–1003, <https://doi.org/10.3892/or.00000527>.
- [69] P.H. Tan, S.S. Chia, S.L. Toh, J.C. Goh, S.S. Nathan, Three-dimensional spatial configuration of tumour cells confers resistance to chemotherapy independent of drug delivery, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 10 (2016) 637–646, <https://doi.org/10.1002/term.1800>.
- [70] D.C. Belisario, M. Akman, M. Godel, V. Campani, M.P. Patrício, L. Scotti, C.M. Hatzinger, G. De Rosa, M. Donadelli, M. Serra, J. Kopecka, C. Riganti, ABCA1/ABCB1 ratio determines chemo- and immune-sensitivity in human osteosarcoma, *Cells* 9 (2020) 647, <https://doi.org/10.3390/ce9030647>.
- [71] T. Jiang, J. Zhao, S. Yu, Z. Mao, C. Gao, Y. Zhu, C. Mao, L. Zheng, Untangling the response of bone tumor cells and bone forming cells to matrix stiffness and adhesion ligand density by means of hydrogels, *Biomaterials* 188 (2019) 130–143, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.10.015>, Erratum in: *Biomaterials* 231 (2020) 119663.
- [72] T. Jiang, G. Xu, X. Chen, X. Huang, J. Zhao, L. Zheng, Impact of Hydrogel Elasticity and Adherence on Osteosarcoma Cells and Osteoblasts, *Adv. Healthc. Mater.* 8 (2019) e1801587, <https://doi.org/10.1002/adhm.201801587>, Erratum in: *Adv. Healthc. Mater.* (9) 2020 e2000054.
- [73] E.R. Molina, L.K. Chim, M.C. Salazar, S.M. Mehta, B.A. Menegaz, S.E. Lamhamedi-Cherradi, T. Satish, S. Mohiuddin, D. McCall, A.M. Zaske, B. Cuglievan, A.J. Lazar, D.W. Scott, J.K. Grande-Allen, J.A. Ludwig, A.G. Mikos, Mechanically tunable coaxial electrospun models of YAP/TAZ mechanoreponse and IGF-1R activation in osteosarcoma, *Acta Biomater.* 100 (2019) 38–51, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.09.029>.
- [74] B. Fallica, J.S. Maffei, S. Villa, G. Malkin, M. Zaman, Alteration of cellular behavior and response to PI3K pathway inhibition by culture in 3D collagen gels, *PLoS One* 7 (2012) e48024, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048024>.
- [75] S. Marastoni, G. Ligresti, E. Lorenzon, A. Colombatti, M. Mongiat, Extracellular matrix: a matter of life and death, *Connect. Tissue Res.* 49 (2008) 203–206, <https://doi.org/10.1080/0308200802143190>.
- [76] K.M. Charoen, B. Fallica, Y.L. Colson, M.H. Zaman, M.W. Grinstaff, Embedded multicellular spheroids as a biomimetic 3D cancer model for evaluating drug and drug-device combinations, *Biomaterials* 35 (2014) 2264–2271, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.038>.
- [77] C. Bai, M. Yang, Z. Fan, S. Li, T. Gao, Z. Fang, Associations of chemo- and radio-resistant phenotypes with the gap junction, adhesion and extracellular matrix in a three-dimensional culture model of soft sarcoma, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 34 (2015) 58, <https://doi.org/10.1186/s13046-015-0175-0>.
- [78] I. Palubekaitė, L. Crooks, D.P. Smith, L.M. Cole, H. Bram, C. Le Maître, M.R. Glench, N.A. Cross, Mass spectrometry imaging of endogenous metabolites in response to doxorubicin in a novel 3D osteosarcoma cell culture model, *J. Mass Spectrom.* 55 (2020) e4461, <https://doi.org/10.1002/jms.4461>.
- [79] D.W. Green, E.J. Kim, H.S. Jung, Spontaneous gene transfection of human bone cells using 3D mineralized alginate-chitosan microcapsules, *J. Biomed. Mater. Res. A* 103 (2015) 2855–2863, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35414>.
- [80] C. Gorgun, S. Öztürk, S. Gokalp, S. Vatansever, S.L. Gurhan, A.S. Urkmez, Synergistic role of three dimensional niche and hypoxia on conservation of cancer stem cell phenotype, *Int. J. Biol. Macromol.* 90 (2016) 20–26, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.12.053>.
- [81] I. Barbato, M. Bocchetti, A. Di Biase, T. Regid, Cancer stem cells and targeting strategies, *Cells* 8 (2019) 926, <https://doi.org/10.3390/ce8080926>.
- [82] F.M. Vallette, C. Olivier, F. Lézet, L. Olivier, D. Cochoneau, L. Lalier, P.F. Carron, D. Heymann, Dormant, quiescent, tolerant and persister cells: Four synonyms for the same target in cancer, *Biochem. Pharmacol.* 162 (2019) 169–176, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.11.004>.
- [83] S. Öztürk, C. Gorgun, S. Gokalp, S. Vatansever, A. Sendemir, Development and characterization of cancer stem cell-based tumoroids as an osteosarcoma model, *Biotechnol. Bioeng.* 117 (2020) 2527–2539, <https://doi.org/10.1002/bit.27381>.
- [84] G. Bassi, S. Panzeri, S.M. Dozio, M. Sandri, E. Campodoni, M. Dappporto, S. Sprio, A. Tampieri, M. Montesi, Scaffold-based 3D cellular models mimicking the heterogeneity of osteosarcoma stem cell niche, *Sci. Rep.* 10 (2020) 22294, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79448-y>.
- [85] J. Tornin, A. Villazante, X. Solé-Martí, M.P. Ginebra, C. Canal, Osteosarcoma tissue-engineered model challenges oxidative stress therapy revealing promoted cancer stem cell properties, *Free Radic. Biol. Med.* 164 (2021) 107–118, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.12.437>.
- [86] C. Gebhard, I. Miller, K. Hummel, M. Neschi Née Ondrovics, S. Schlosser, I. Walter, Comparative proteome analysis of monolayer and spheroid culture of canine osteosarcoma cells, *J. Proteomics* 177 (2018) 124–136, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.01.006>.
- [87] C. Trojani, P. Weiss, J.F. Michiels, C. Vinatier, J. Guichoux, G. Duculsi, P. Gaudray, G.F. Carle, N. Roche, Three-dimensional culture and differentiation of human osteogenic cells in an injectable hydroxypropylmethylcellulose hydrogel, *Biomaterials* 26 (2005) 5509–5517, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.02.001>.
- [88] G. Turnbull, J. Clarke, F. Picard, P. Riches, L. Jia, F. Han, B. Li, W. Shu, 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering, *Bioact. Mater.* 3 (2017) 278–314, <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.10.001>.
- [89] X. Liu, A.E. Jakus, M. Kural, H. Qian, A. Engler, M. Ghaedi, R. Shah, D.M. Steinbacher, L.E. Niklason, Vascularization of Natural and Synthetic Bone Scaffolds, *Cell Transplant* 27 (2018) 1269–1280, <https://doi.org/10.1177/0963689718782452>.
- [90] G. Picone, C. Cappadone, A. Pasini, J. Lovecchio, M. Cortesi, G. Farruggia, M. Lombardo, A. Gianoncelli, L. Mancini, H.M. Rafé, S. Donato, E. Giordano, E. Malucelli, S. Iotti, Analysis of Intracellular Magnesium and Mineral Depositions during Osteogenic Commitment of 3D Cultured Saos-2 Cells, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 2368, <https://doi.org/10.3390/ijms21072368>.
- [91] M. Pridoux, A.R. Wijenayaka, D.J. Kumarasinghe, R.T. Ormsby, A. Evdokiou, D.M. Findlay, G.J. Atkins, SaOS2 Osteosarcoma cells as an in vitro model for

- studying the transition of human osteoblasts to osteocytes, *Calcif Tissue Int* 95 (2014) 183–193, <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9879-y>.
- [92] T. Kihara, C. Umezū, K. Sawada, Y. Furutani, Osteogenic cells form mineralized particles, a few μm in size, in a 3D collagen gel culture, *PeerJ* 7 (2019) e7889, <https://doi.org/10.7717/peerj.7889>.
- [93] D. Couchourel, C. Escoffier, R. Rohanizadeh, S. Bohic, G. Daculsi, Y. Fortun, M. Padrines, Effects of fibronectin on hydroxyapatite formation, *J. Inorg. Biochem.* 73 (1999) 129–136, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.1998.09.006>.
- [94] M. Padrines, R. Rohanizadeh, C. Damiens, D. Heymann, Y. Fortun, Inhibition of apatite formation by vitronectin, *Connect Tissue Res.* 41 (2000) 101–108, <https://doi.org/10.3109/03082000009067662>.
- [95] R. Rohanizadeh, M. Padrines, J.M. Bouler, D. Couchourel, Y. Fortun, G. Daculsi, Apatite precipitation after incubation of biphasic calcium-phosphate ceramic in various solutions: influence of seed species and proteins, *J. Biomed. Mater. Res.* 42 (1998) 530–539, [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(19981215\)42:4<530::aid-jbm8>3.0.co;2-6](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(19981215)42:4<530::aid-jbm8>3.0.co;2-6).
- [96] J.P. Vanderburgh, S.A. Guelcher, J.A. Sterling, 3D bone models to study the complex physical and cellular interactions between tumor and the bone microenvironment, *J. Cell Biochem.* 119 (2018) 5053–5059, <https://doi.org/10.1002/jcb.26774>.
- [97] M. Stoppato, E. Carletti, D. Maniglio, C. Migliaresi, A. Motta, Functional role of scaffold geometries as a template for physiological BCM formation: evaluation of collagen 3D assembly, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 7 (2013) 161–168, <https://doi.org/10.1002/term.516>.
- [98] R. Riesco, I. Boyer, S. Blossie, P.M. Lefebvre, P. Assemat, T. Leichle, A. Accardo, L. Malaquin, Water-in-PDMS emulsion templating of highly interconnected porous architectures for 3D cell culture, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 11 (2019) 28631–28640, <https://doi.org/10.1021/acsami.9b07564>.
- [99] S. Sankar, C.C. Peng, Y.C. Tung, Comparison of VEGF-A secretion from tumor cells under cellular stresses in conventional monolayer culture and microfluidic three-dimensional spheroid models, *PLoS One* 15 (2020) e0240833, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240833>.
- [100] M. Gorska, P.B. Krzywiec, A. Kuban-Jankowska, M. Zmijewska, M. Wozniak, J. Wierzbicka, A. Piotrowska, K. Siwicka, Growth inhibition of osteosarcoma cell lines in 3D cultures: role of nitrosative and oxidative stress, *Anticancer Res.* 36 (2016) 221–229.
- [101] A.L. Gambin, A. Renaud, C. Charrier, P. Hulin, G. Louarn, D. Heymann, V. Trichet, P. Layrolle, Osteoblastic and osteoclastic differentiation of human mesenchymal stem cells and monocytes in a miniaturized three-dimensional culture with mineral granules, *Acta Biomater.* 10 (2014) 5139–5147, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.08.033>.
- [102] H.T. Sasmazel, Novel hybrid scaffolds for the cultivation of osteoblast cells, *Int. J. Biol. Macromol.* 49 (2011) 838–846, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.07.022>.
- [103] K. Zafeiris, D. Brasinika, A. Karatza, E. Koumoulos, L.K. Karoussis, K. Kyriakidou, C.A. Charitidis, Additive manufacturing of hydroxyapatite-chitosan-gelatin composite scaffolds for bone tissue engineering applications, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 119 (2021) 111639, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.11.1639>.
- [104] C. Chen, K. Chen, S.T. Yang, Effects of three-dimensional culturing on osteosarcoma cells grown in a fibrous matrix: analyses of cell morphology, cell cycle, and apoptosis, *Biotechnol. Prog.* 19 (2003) 1574–1582, <https://doi.org/10.1021/bp034024w>.
- [105] V.L. Thai, K.H. Griffin, S.W. Thorpe, R.I. Randall, J.K. Leach, Tissue engineered platforms for studying primary and metastatic neoplasia behavior in bone, *J. Biomech.* 115 (2021) 110189, <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2020.11.0189>.
- [106] S. Hao, L. Ha, G. Cheng, Y. Wan, Y. Xia, D.M. Sosnoski, A.M. Mastro, S.Y. Zheng, A spontaneous 3D bone-on-a-chip for bone metastasis study of breast cancer cells, *Small* 14 (2018) e1702787, <https://doi.org/10.1002/sml.201702787>.
- [107] S. Choudhary, P. Ramasundaram, E. Dziopa, C. Mannion, Y. Kissin, L. Tricoli, C. Albanese, W. Lee, J. Zilberberg, Human ex vivo 3D bone model recapitulates osteocyte response to metastatic prostate cancer, *Sci. Rep.* 8 (2018) 17975, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36424-x>.
- [108] P.S. Raman, C.D. Paul, K.M. Stroka, K. Konstantopoulos, Probing cell traction forces in confined microenvironments, *Lab Chip* 13 (2013) 4599–4607, <https://doi.org/10.1039/c3lc50802a>.
- [109] H. Chaddad, S. Kuchler-Bopp, G. Fuhrmann, H. Gegut, G. Ubeaud-Sequier, P. Schwinté, F. Bornert, N. Benkirane-Jessel, Y. Idoux-Gillet, Combining 2D angiogenesis and 3D osteosarcoma microtissues to improve vascularization, *Exp. Cell Res.* 360 (2017) 138–145, <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.08.035>.
- [110] M. Massimini, R. De Maria, D. Malatesta, M. Romanucci, A. D'Anselmo, S. Saldà, L. Della, Establishment of three-dimensional canine osteosarcoma cell lines showing vasculogenic mimicry and evaluation of biological properties after treatment with 17-AAG, *Vet. Comp. Oncol.* 17 (2019) 376–384, <https://doi.org/10.1111/vco.12482>.
- [111] E.L. Fong, S.E. Lamhamedi-Cherradi, E. Burdett, V. Ramamoorthy, A.J. Lazar, F. K. Kasper, M.C. Farach-Carson, D. Vishwamitra, E.G. Demicco, B.A. Menegaz, H.M. Amin, A.G. Mikos, J.A. Ludwig, Modeling Ewing sarcoma tumors in vitro with 3D scaffolds, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110 (2013) 6500–6505, <https://doi.org/10.1073/pnas.1221403110>.
- [112] K.A. Boehme, J. Nitsch, R. Rieker, R. Handgretinger, S.B. Schleicher, T. Kluba, E. Traub, Arsenic trioxide potentiates the effectiveness of etoposide in Ewing sarcomas, *Int. J. Oncol.* 49 (2016) 2135–2146, <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3700>.
- [113] M. Santoro, S.E. Lamhamedi-Cherradi, B.A. Menegaz, J.A. Ludwig, A.G. Mikos, Flow perfusion effects on three-dimensional culture and drug sensitivity of Ewing sarcoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112 (2015) 10304–10309, <https://doi.org/10.1073/pnas.1506684112>.
- [114] E.R. Molina, L.K. Chim, M.C. Salazar, G.L. Koons, B.A. Menegaz, A. Ruiz-Velasco, S.E. Lamhamedi-Cherradi, A.M. Vetter, T. Satish, B. Cuglevan, M.M. Smoak, D. W. Scott, J.A. Ludwig, A.G. Mikos, 3D Tissue-Engineered Tumor Model for Ewing's sarcoma that incorporates bone-like ECM and mineralization, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 6 (2020) 539–552, <https://doi.org/10.1021/acsbomater.9b01068>.
- [115] A. Marturano-Kruik, A. Villasante, K. Yaeger, S.R. Ambati, A. Chramiec, M.T. Raimondi, G. Vunjak-Novakovic, Biomechanical regulation of drug sensitivity in an engineered model of human tumor, *Biomaterials* 150 (2018) 150–161, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.10.020>.
- [116] W.A. May, R.S. Grigoryan, N. Keshelava, D.J. Cabral, L.J. Christensen, J. Jenabi, L. Ji, T.J. Triche, E.R. Lawlor, C.P. Reynolds, Characterization and drug resistance patterns of Ewing's sarcoma family tumor cell lines, *PLoS One* 8 (2013) e60060, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080060>.
- [117] K. Leuchte, B. Altwater, S. Hoffschlag, J. Potraz, J. Meltzer, D. Clemens, A. Luedke, J. Hades, U. Dirksen, H. Jaerens, S. Kalayngri, C. Rossig, Anchorage-independent growth of Ewing sarcoma cells under serum-free conditions is not associated with stem-cell like phenotype and function, *Oncol. Rep.* 32 (2014) 845–852, <https://doi.org/10.3892/or.2014.3269>.
- [118] A. Villasante, A. Marturano-Kruik, G. Vunjak-Novakovic, Bioengineered human tumor within a bone niche, *Biomaterials* 35 (2014) 5785–5794, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.03.081>.
- [119] A. Marturano-Kruik, A. Villasante, G. Vunjak-Novakovic, Bioengineered Models of Solid Human Tumors for Cancer Research, *Methods Mol Biol.* 1502 (2016) 203–211, <https://doi.org/10.1007/978-1-2016-353>, Erratum in: *Methods Mol Biol.* 1502 (2016) E1.
- [120] S. Riffle, R.N. Pandey, M. Albert, R.S. Hegde, Linking hypoxia, DNA damage and proliferation in multicellular tumor spheroids, *BMC Cancer* 17 (2017) 338, <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3319-0>.
- [121] G. Domenici, R. Eduardo, H. Castillo-Edja, G. Orive, A. Montero Carcaboso, C. Brito, PDX-Derived Ewing's sarcoma cells retain high viability and disease phenotype in alginate encapsulated spheroid cultures, *Cancers (Basel)* 13 (2021) 879, <https://doi.org/10.3390/cancers13040879>.
- [122] S. Riffle, R.S. Hegde, Modeling tumor cell adaptations to hypoxia in multicellular tumor spheroids, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 36 (2017) 102, <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0570-9>.
- [123] E. David, F. Blanchard, M.F. Heymann, G. De Pinieux, F. Gouin, F. Rédini, D. Heymann, The bone niche of chondrosarcoma: a sanctuary for drug resistance, tumour growth and also a source of new therapeutic targets, *Sarcoma* 2011 (2011) 932451, <https://doi.org/10.1155/2011/932451>.
- [124] H.L. Evans, A.G. Ayala, M.M. Romsdahl, Prognostic factors in chondrosarcoma of bone: a clinicopathologic analysis with emphasis on histologic grading, *Cancer* 40 (1977) 818–831, [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197708\)40:2<818::aid-cnrcr2820400234>3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197708)40:2<818::aid-cnrcr2820400234>3.0.co;2-b).
- [125] S. Boeuf, E. Steck, K. Pelletan, T. Hennig, A. Buneb, K. Benz, D. Witte, H. Süßmann, A. Poustka, W. Richter, Subtractive gene expression profiling of articular cartilage and mesenchymal stem cells: serpins as cartilage-relevant differentiation markers, *Osteoarthritis Cartilage* 16 (2008) 48–60, <https://doi.org/10.1016/j.joca.2007.05.008>.
- [126] S. Boeuf, P. Kunz, T. Hennig, B. Lehner, P. Hogendorn, J. Bovée, W. Richter, A chondrogenic gene expression signature in mesenchymal stem cells is a classifier of conventional central chondrosarcoma, *J. Pathol.* 216 (2008) 158–166, <https://doi.org/10.1002/path.2389>.
- [127] D. Monderer, A. Lusou, A. Bellec, E. David, S. Ponsoille, S. Saiaigh, S. Bercegeay, P. Piloquet, M.G. Denis, L. Lodé, F. Rédini, M. Biger, D. Heymann, M.F. Heymann, R. Le Bot, F. Gouin, F. Blanchard, New chondrosarcoma cell lines and mouse models to study the link between chondrogenesis and chemoresistance, *Lab Invest.* 93 (2013) 1100–1114, <https://doi.org/10.1038/labinvest.2013.101>.
- [128] J.G. Van Oosterwijk, B. Hesters, D. Meijer, L.H. Briere-de Bruijn, A.M. Cleton-Jansen, H. Gelderblom, B. van de Water, J.V. Bovée, Restoration of chemosensitivity for doxorubicin and cisplatin in chondrosarcoma in vitro: BCL-2 family members cause chemoresistance, *Ann. Oncol.* 23 (2012) 1617–1626, <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr512>.
- [129] C.M. Reijnders, C.J. Waaijer, A. Hamilton, E.P. Biddings, S.P. Dijkstra, J. Ham, E. Bakker, K. Szuhai, M. Karperien, P.C. Hogendoorn, S.E. Stringer, J.V. Bovée, No haploinsufficiency but loss of heterozygosity for EGT in multiple osteochondromas, *Am. J. Pathol.* 177 (2010) 1946–1957, <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100296>.
- [130] A. Voissiere, E. Jouberton, E. Maubert, F. Degoul, C. Peyrode, J.M. Chezal, É. Miot-Noirault, Development and characterization of a human three-dimensional chondrosarcoma culture for in vitro drug testing, *PLoS One* 12 (2017) e0181340, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181340>.
- [131] A. Voissiere, V. Weber, Y. Gerard, F. Rédini, F. Raes, J.M. Chezal, F. Degoul, C. Peyrode, É. Miot-Noirault, Proteoglycan-targeting applied to hypoxia-activated prodrug therapy in chondrosarcoma: first proof-of-concept, *Oncotarget* 8 (2017) 95824–95840, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21337>.
- [132] C. Peyrode, V. Weber, E. David, A. Vidal, P. Auzeloux, Y. Communal, M.M. Dauplat, S. Besse, F. Gouin, D. Heymann, J.M. Chezal, F. Rédini, É. Miot-Noirault, Quaternary ammonium-melphalan conjugate for anticancer therapy of chondrosarcoma: in vitro and in vivo preclinical studies, *Invest. New Drugs* 30 (2012) 1782–1790, <https://doi.org/10.1007/s10637-011-9663-z>.

- [133] F. Perut, F.V. Sbrana, S. Avnet, A. De Mito, N. Baldini, Spheroid-based 3D cell cultures identify salinomycin as a promising drug for the treatment of chondrosarcoma, *J. Orthop. Res.* (2018), <https://doi.org/10.1002/jor.23880>, Online ahead of print.
- [134] E. Ihuissier, C. Bazille, J. Aury-Landas, N. Girard, J. Pontin, M. Boittin, K. Boumediene, C. Baugé, Identification of an easy to use 3D culture model to investigate invasion and anticancer drug response in chondrosarcomas, *BMC Cancer* 17 (2017) 490, <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3478-z>.
- [135] I. Palubeckaitė, S. Venneker, J.H. Briaire-de Bruijn, B.E. van den Akker, A.D. Krol, H. Gelderblom, J.V.M.G. Bovée, Selection of effective therapies using three-dimensional in vitro modeling of chondrosarcoma, *Front. Mol. Biosci.* 7 (2020) 566291, <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.566291>.
- [136] D.H. Hamdi, S. Barbieri, F. Chevalier, J.E. Groetz, E. Legendre, M. Demoor, P. Galera, J.L. Lefaix, Y. Sainigny, In vitro engineering of human 3D chondrosarcoma: a preclinical model relevant for investigations of radiation quality impact, *BMC Cancer* 15 (2015) 579, <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1590-5>.
- [137] D. Vautier, J. Hemmerlé, C. Vodouhe, G. Koenig, I. Richert, C. Picart, J.C. Voegel, C. Debry, J. Chluba, J. Ogier, 3-D surface charges modulate protrusive and contractile contacts of chondrosarcoma cells, *Cell Motil. Cytoskeleton* 56 (2003) 147–158, <https://doi.org/10.1002/cm.10140>.
- [138] M. Minopoli, S. Sarno, G. Di Carluccio, R. Azzaro, S. Costantini, F. Fazioli, M. Gallo, G. Apice, I. Cannella, D. Rea, M.P. Stoppelli, D. Borschi, A. Budillon, K. Scotlandi, A. De Chiara, M.V. Carriero, Inhibiting monocyte recruitment to prevent the pro-tumoral activity of tumor-associated macrophages in chondrosarcoma, *Cells* 9 (2020) 1062, <https://doi.org/10.3390/cells9041062>.
- [139] M.V. Carriero, K. Bifulco, M. Minopoli, L. Lista, O. Maglio, L. Mele, G. Di Carluccio, M. De Rosa, V. Pavone, UPARANT: a urokinase receptor-derived peptide inhibitor of VEGF-driven angiogenesis with enhanced stability and in vitro and in vivo potency, *Mol. Cancer Ther.* 13 (2014) 1092–1104, <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0949>.
- [140] V.A. Parfenov, V.A. Mironov, K.A. van Kampen, P.A. Karalkin, E.V. Koudan, E.D. Pereira, S.V. Petrov, E.K. Nezhurina, O.E. Petrov, M.J. Myasnikov, F.X. Walboomers, H. Engelkamp, P. Christianen, Y.D. Khesuani, L. Moroni, C. Mota, Scaffold-free and label-free biofabrication technology using levitational assembly in a high magnetic field, *Biofabrication* 12 (2020) 045022, <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab7554>.







**Titre :** Evaluation des effets et du devenir de xénobiotiques dans un contexte d'administration orale par l'utilisation de méthodes alternatives *in vitro*

**Mots clés :** Xénobiotiques, affitines, herbicides, barrière intestinale, perméabilité cellulaire

**Résumé :** Les xénobiotiques représentent toutes les molécules étrangères à l'organisme humain auxquelles il sera exposé au cours de sa vie. Pour se prémunir de leurs potentiels effets néfastes, le corps possède des barrières biologiques. Lorsque les xénobiotiques entrent par la voie orale, c'est la barrière intestinale qui va être la plus impactée.

Aussi, notre objectif est d'utiliser des modèles *in vitro* simples et reproductibles pour l'évaluation du comportement de xénobiotiques sur cette barrière.

La première partie de cette étude a porté sur le comportement d'une protéine de ciblage de la barrière à visée thérapeutique (affitine) dans le tractus digestif.

Dans ce sens, des modèles synthétiques reproduisant le liquide gastrique et intestinal ont permis de tester sa résistance aux contraintes physico-chimiques. Les outils d'ingénierie protéique nous ont permis de modifier l'affitine pour qu'elle lutte plus efficacement contre les conditions extrêmes de la voie orale.

La deuxième partie du projet s'est consacrée aux xénobiotiques présents dans les eaux de boissons. L'action de différents herbicides a été testée sur un modèle de barrière intestinale reproduit avec une lignée cellulaire Caco-2 différenciée. Comme la perméabilité cellulaire est un élément-clé dans l'homéostasie intestinale, une investigation plus poussée a été menée sur les protéines de jonctions cellulaires.

Face à une augmentation des expositions aux xénobiotiques, il y a un intérêt croissant d'identifier leurs effets délétères ou non sur la santé humaine. Nos travaux, pris dans leur ensemble, mettent en évidence que des méthodes alternatives *in vitro* sont d'excellentes approches pour extrapoler des situations *in vivo*. Elles permettent d'étudier les impacts des xénobiotiques sur notre organisme, de façon prédictive et rapide, et sans l'utilisation de l'expérimentation animale.

**Title :** Evaluation of the effects and fate of xenobiotics in the context of oral administration using alternative *in vitro* methods

**Keywords:** Xenobiotics, Affitins, herbicides, intestinal barrier, cellular permeability

**Abstract:** Xenobiotics are all molecules that are foreign to the human organism and to which it will be exposed during its life. To protect itself from their potential harmful effects, the body is equipped with biological barriers. When xenobiotics enter the body orally, the intestinal barrier is the most impacted.

Our objective is to use simple and reproducible *in vitro* models to evaluate the behaviour of xenobiotics on the intestinal barrier.

The first part of this study focused on the behaviour of therapeutic barrier targeting protein (affitin) in the digestive tract. First, synthetic models reproducing gastric and intestinal fluids were used to test its resistance to physicochemical constraints.

Protein engineering tools have allowed us to modify the affitin to fight more efficiently against the extreme conditions of the oral route.

The second part of the project focused on xenobiotics in drinking waters. The action of different herbicides was tested on a model of the intestinal barrier reproduced with a differentiated Caco-2 cell line. As cellular permeability is a key element in intestinal homeostasis, further investigation was carried out on cell junction proteins.

With increasing exposures to xenobiotics, there is a rising interest in identifying their deleterious or non-deleterious effects on human health.

Our work highlights that alternative *in vitro* methods are excellent approaches to extrapolate from *in vivo* situations. They allow us to study the impacts of xenobiotics on our organism, in a predictive and rapid manner, and without the use of animal experimentation.