



HAL
open science

Optimisation d'approches combinées de métabolomique pour l'étude des effets métaboliques hépatiques induits par l'exposition à l'acide perfluorooctanoïque

Joran Villaret Cazadamont

► **To cite this version:**

Joran Villaret Cazadamont. Optimisation d'approches combinées de métabolomique pour l'étude des effets métaboliques hépatiques induits par l'exposition à l'acide perfluorooctanoïque. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2021. Français. NNT : 2021INPT0038 . tel-04170614

HAL Id: tel-04170614

<https://theses.hal.science/tel-04170614>

Submitted on 25 Jul 2023

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

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



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

M. JORAN VILLARET CAZADAMONT

le mercredi 14 avril 2021

Titre :

Optimisation d'approches combinées de métabolomique pour l'étude des effets métaboliques hépatiques induits par l'exposition à l'acide perfluorooctanoïque

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Toxicologie Alimentaire (ToxAlim)

Directeur(s) de Thèse :

M. DANIEL ZALKO

MME NATHALIE POUPIN

Rapporteurs :

Mme FREDERIQUE COURANT, UNIVERSITE DE MONTPELLIER

M. OLIVIER LAPREVOTE, UNIVERSITE PARIS 5

Membre(s) du jury :

M. JEAN-CHARLES PORTAIS, INSA TOULOUSE, Président

M. DANIEL ZALKO, INRA TOULOUSE, Membre

Mme ANNE CORLU, UNIVERSITE RENNES 1, Membre

Mme NATHALIE POUPIN, INRA TOULOUSE, Membre

M. NICOLAS CABATON, INRA TOULOUSE, Invité

Remerciements

Avant tout, je tiens à remercier la région Occitanie et l'INRAE pour avoir accepté de financer ces trois années de thèse. Merci aussi au laboratoire ToxAlim de m'avoir accueilli pour mener à bien l'ensemble des travaux de ce projet.

Tout d'abord, je tiens à remercier Nicolas CABATON, Nathalie POUPIN et Daniel ZALKO pour m'avoir encadré tout au long de cette thèse et pour m'avoir guidé même dans les moments les plus difficiles. Je tiens particulièrement à les remercier pour leur gentillesse, leur disponibilité et pour les nombreux encouragements du premier jusqu'au dernier jour.

Je tiens aussi à remercier tous les membres de l'équipe MeX pour leur gentillesse et pour toute l'aide qu'ils m'ont apporté durant cette thèse. Je pense notamment aux expériences de quenching qui ont été très conviviales. Pour essayer de nommer l'ensemble des participants, je souhaite dire un grand merci à Sandrine, Élodie, Nicolas, Nathalie, Louisa, Kévin, Florence, Laure, Mathilde, Anne, Fabien, Daniel, Clément et Loïc, en espérant aucun oubli. On se retrouve bientôt pour de nouvelles pâtisseries.

J'exprime mes sincères remerciements aux plateformes de métabolomique Métatoul pour l'ensemble des analyses métabolomiques et lipidomiques réalisées au cours de ce projet. Plus particulièrement je tiens à remercier Floriant, Noémie, ainsi que les autres membres de l'équipe du TBI de Toulouse pour toute l'aide apportée. Un grand merci aux membres de la plateforme de lipidomique de Toulouse de l'INSERM de Ranguel et plus particulièrement à Justine, Anthony, Aurélie et Julia pour les expériences réalisées dans la bonne humeur. Je remercie également la plateforme AXIOM de ToxAlim, notamment Cécile, Roselyne, Emilien, Jean-François, Marie et Laurent pour l'aide apportée lors des expériences et les analyses statistiques.

J'adresse tous mes remerciements à Madame Frédérique COURANT, ainsi qu'à Monsieur Olivier LAPREVOTE d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Ainsi qu'à Jean-Charles PORTAIS et Anne CORLU qui ont accepté de faire partie du jury en tant qu'examinateurs. Je souhaite aussi remercier les membres de mon comité de thèse Jean-Philippe ANTIGNAC, Jean-Charles PORTAIS, Bernard FROMENTY et Jean-Pierre CRAVEDI pour leur expertise et leurs conseils.

Sur un point plus personnel, j'aimerais remercier l'ensemble des membres de ma famille pour m'avoir toujours soutenu et d'être toujours derrière moi pour tout ce que j'entreprends. Je tiens particulièrement à remercier ma compagne pour son immense soutien et son aide durant ce travail. Tu as toujours cru en moi et m'as encouragé depuis le début et je n'en serais probablement pas là sans toi.

Liste des figures

Figure 1 : Schéma adapté de la publication Jurowski et ses collaborateurs (Jurowski et al. 2017) représentant la place de la métabolomique dans la cascade des technologies omiques.

Figure 2 : Nombre de publications liées au terme « metabolomics » sur la plateforme de publication Pubmed entre 1998 et 2020.

Figure 3 : Structure simplifiée d'un spectromètre de masse associé à des techniques chromatographiques

Figure 4 : Schéma résumant les différentes étapes du workflow métabolomique

Figure 5 : Présentation de la structure chimique de l'acide perfluorooctane sulfonique (PFOS), de l'alcool fluorotélomère 8:2 (8:2 FTOH) et du Polytétrafluoroéthylène (PTFE).

Figure 6 : Classification OCDES des PFAS (OCDE 2018)

Figure 7 : Structure chimique de l'acide perfluorooctanoïque (PFOA)

Figure 8 : Concentrations plasmatiques en PFOA chez l'Homme, classées par genre et par âge (n=69 030).

Figure 9 : schéma résumant les différents effets du PFOA étudiés chez l'homme (bleu clair) et chez les animaux (bleu foncé).

Figure 10 : Cycle de culture des cellules HepaRG selon le protocole initial décrit par (Gripon et al. 2002).

Figure 11 : Schéma provenant d'un article de revue (León et al. 2013) traduit en français, et illustrant et résumant les différentes approches d'arrêt du métabolisme cellulaire et d'extraction utilisées dans les analyses métabolomiques sur cellules adhérentes.

Figure 12 : Protocole standard (A) et protocole de fast-quenching (B) permettant l'arrêt du métabolisme cellulaire.

Figure 13 : Schéma résumant les différentes expérimentations réalisées afin de comparer le protocole standard et le protocole de fast-quenching.

Figure 14 : Comparaison des quantités mesurées de l'isoleucine et de l'acide 2-hydroxyglutarique dans les échantillons avec et sans cellules entre le protocole de fast-quenching et le protocole standard.

Figure 15 : Comparaison de la contamination des échantillons blancs sans cellules entre le protocole de Fast-Quenching et le protocole standard.

Figure 16 : Comparaison des coefficients de variation obtenus pour chaque métabolite mesuré entre les deux protocoles.

Figure 17 : Score plots des analyses en composantes principales réalisées sur les données de RMN (A), de spectrométrie de masse non ciblée en mode d'ionisation négative (B) et positive (C).

Figure 18 : Diagramme de Venn comparant le nombre de métabolites extraits dans chacun des deux protocoles.

Figure 19 : Schéma du protocole expérimental mis en place pour l'étude de l'évolution du métabolome sur plusieurs passages cellulaires successifs sur le modèle HepaRG.

Figure 20 : Abondances relatives obtenues pour six métabolites polaires sur la lignée cellulaire HepaRG sur 7 passages successifs (n=9).

Figure 21 : Score plots des analyses en composantes principales réalisées sur les variables issues des analyses de spectrométrie de masse en mode d'ionisation positive (A) et négative (B), sur 7 passages cellulaires successifs.

Figure 22 : Schéma expérimental des méthodes d'extractions classiques et de double extraction utilisées pour effectuer des analyses de métabolomique et de lipidomique.

Figure 23 : Comparaison de la récupération des métabolites polaires pour les méthodes classique (barres noires) et de double extraction (barres blanches).

Figure 24 : Comparaison de la distribution qualitative des acides aminés (AA) et des métabolites énergétiques entre les méthodes d'extraction classique et double extraction.

Figure 25 : Comparaison de la récupération des classes de lipides entre la méthode classique et la méthode de double extraction.

Figure 26 : Comparaison de la distribution qualitative des espèces de sphingomyéline (SM) et de triglycérides (TG) entre la méthode classique et la méthode de double extraction.

Figure 27 : Effet d'une forte concentration de fénofibrate (450 μ M) sur les cellules HepaRG.

Figure 28 : Mesure de la viabilité cellulaire des cellules HepaRG après 28 jours d'exposition à une gamme de concentration en PFOA.

Figure 29 : Dosage des enzymes hépatiques ASAT et ALAT dans les milieux de culture du modèle HepaRG après exposition au PFOA pour 1 jour (A) et 28 jours (B).

Figure 30 : Dosage de l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans le modèle HepaRG après exposition au PFOA pour 1 jour (A) et 28 jours (B).

Figure 31 : Chromatogramme typique obtenu par l'analyse radio-HPLC des milieux extracellulaires obtenus après 24h d'exposition des cellules HepaRG.

Figure 32 : Tableaux bilan de la radioactivité moyenne retrouvée dans les milieux extracellulaires, solutions de lavages et contenus intracellulaires pour le PFOA et le BPA (10 µM) après plusieurs temps d'exposition.

Figure 33 : Effet du PFOA sur les concentrations ou les abondances relatives obtenues pour le cholestérol, le glucose 6 phosphate, la phosphoéthanolamine (PE) (38a :4) et l'alanine après 1 jours d'exposition sur les cellules HepaRG.

Figure 34 : Effet du PFOA sur les concentrations ou les abondances relatives mesurées pour l'aspartate, l'α-cétaglutarate, le citrate, le malate, le fumarate et le (PE) phosphoéthanolamine (32a :2) après 28 jours d'exposition sur les cellules HepaRG.

Figure 35 : Score plots issus des analyses OPLS-DA réalisées sur les données de métabolomique non ciblée pour la comparaison des cellules non exposées (DMSO) et les cellules exposées aux différentes concentrations en PFOA.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Avantages et inconvénients de la RMN et de la SM

Tableau 2 : Tableau résumant une partie des études des concentrations en PFOA retrouvées dans des eaux dans différents pays.

Tableau 3 : Tableau résumant une partie des études concernant les concentrations plasmatiques en PFOA retrouvées chez l'Homme dans différents types de populations.

Tableau 4 : Concentrations plasmatiques en PFOA mesurées par des programmes de biosurveillance entre les années 2000 et 2014 (EFSA 2018).

Tableau 5 : Différences des temps de demi vie (T1/2) estimés pour plusieurs espèces animales et chez l'Homme, pour le PFOA.

Tableau 6 : Principaux effets du PFOA observés au niveau hépatique chez l'animal.

Tableau 7 : Principaux effets métaboliques du PFOA observés chez l'Homme.

Tableau 8 : Résumé des études métabolomiques réalisées au niveau hépatique sur le PFOA in vitro et in vivo.

Tableau 9 : Ensemble des paramètres permettant d'obtenir des solutions radioactives en PFOA à 3 333 Bq pour différentes concentrations en PFOA.

Tableau 10 : pourcentage moyen de radioactivité retrouvée dans les milieux extracellulaires, les solutions de lavage et les contenus intracellulaires pour chaque concentration en PFOA.

Tableau 11 : Effet de l'exposition au PFOA sur les concentrations d'acides aminés intracellulaires après 1 jour d'exposition.

Tableau 12 : Effet de l'exposition au PFOA sur les abondances des métabolites énergétiques intracellulaires après 1 jour d'exposition.

Tableau 13 : Effets du PFOA sur les différentes classes de lipides intracellulaires après 1 jour d'exposition.

Tableau 14 : Nombre de variables discriminantes significatives obtenues pour chaque modèle OPLS-DA valide sur l'ensemble des conditions.

Liste des abréviations

ACP : Analyse en Composante Principale
ADN : Acide désoxyribonucléique
ALAT : alanine aminotransférase
ANOVA : ANalysis Of Variance
ANSES : Agence Nationale de Sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ARN : Acide ribonucléique
ASAT : aspartate aminotransférase
BPA : Bisphénol A
CAMERA : Collection of Algorithms for MEtabolite pRofile Annotation
CAR : constitutive androstane receptor
CER : céramides
CYP : cytochromes P450
DHT : Dose Hebdomadaire Tolérable
DJT : dose journalière tolérable
DMSO : diméthyl sulfoxyde
Dpm : désintégrations par minute
ECHA : European Chemicals Agency
EFSA : European Food Safety Authority
ER α : Estrogen receptors alpha
FDR : False Discovery Rate
FTOH : fluorotelomer alcohol
FTSA : fluorotelomer sulfonate
GGT : Gamma-glutamyltranspeptidase
HILIC : Hydrophilic Interaction LIquid Chromatography

HPLC : High Performance Liquid Chromatography
IDMS : Isotope dilution mass spectrometry
INRAE : Institut National de la Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement
ISERM : Institut national de la santé et de la recherche médicale
MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economiques
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OPLS-DA : Orthogonal partial least squares discriminant analysis
PC : phosphocholines
PE : phosphoéthanolamines
PFAA : Perfluoroalkyl acids
PFAS : per- and polyfluoroalkyl substances
PFBS : Perfluorobutanesulfonic acid
PFC : Perfluorinated Compounds
PFHpA : perfluoroheptanoic acid
PFHxA : Perfluorohexanoic acid
PFHxS : Perfluorohexanesulphonic acid
PFNA : perfluorononanoic acid
PFOA : perfluorooctanoic acid
PFOS : perfluorooctanesulfonic acid
PFUnDA : perfluoroundecanoic acid
PI : phosphatidylinositols
PLS-DA : Partial least squares-discriminant analysis
PPAR α : Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PTFE : Polytetrafluoroethylene
PXR : pregnane X receptor
QC : Quality control
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
SDM : Spectrométrie de Masse
SM : sphingomyélines
SVF : sérum de veau fœtal
TBI : Toulouse Biotechnology Institute
TG : triglycérides
TSP : Acide triméthylsilylpropanoïque
UE : Union Européenne
UPLC : Ultra Performance Liquid Chromatography
USA : Etat-Unis d'Amérique
US-EPA : United States Environmental Protection Agency
VIP : variable importance in projection
W4M : workflow4metabolomics

Table des matières

Table des matières

1. Introduction	1
1.1 Introduction générale et contexte en toxicologie	2
1.2 La métabolomique : un outil pertinent pour étudier les effets métaboliques des contaminants alimentaires	8
1.2.1 Définition et domaines d'application	8
1.2.2 Les stratégies et outils analytiques en métabolomique.....	12
1.2.3 Quels sont les étapes clés dans une analyse métabolomique ?....	20
1.3 Les PFAS : des contaminants persistants avec des effets fortement suspectés sur la santé humaine.....	29
1.3.1 Que sont les PFAS ?	29
1.3.2 L'acide perfluorooctanoïque (PFOA) : une problématique mondiale	34
1.3.3 Législation actuelle concernant le PFOA	43
1.3.4 Les effets toxiques suspectés du PFOA.....	45
1.4 Problématique et objectifs du travail de thèse.....	58
2. Approches et choix méthodologiques pour le projet	63
2.1 Le modèle cellulaire HepaRG.....	64
2.2 Les approches métabolomiques adoptées pour l'étude des effets du PFOA <i>in vitro</i>	70
2.2.1 Les approches de métabolomique ciblée utilisées	70
2.2.2 Les approches métabolomiques non ciblées.....	72
2.2.3 L'adaptation des protocoles pour la combinaison des protocoles..	74
3. Optimisation des étapes clés de l'analyse métabolomique pour l'étude des effets métaboliques globaux	77
3.1 Optimisation du protocole de collecte et de préparation des échantillons cellulaires.....	80
3.1.1 Introduction et problématique	80

3.1.2	Matériel et méthodes.....	85
3.1.3	Résultats et discussion	92
3.1.4	Conclusion	102
3.2	Optimisation de l'utilisation du modèle cellulaire pour limiter la variabilité inter-échantillons	104
3.2.1	Introduction et problématique	104
3.2.2	Matériel et méthodes.....	106
3.2.3	Résultats et discussion	108
3.2.4	Conclusions.....	113
3.3	Amélioration de la couverture du métabolome sur un même échantillon	114
3.3.1	Introduction et problématique	114
3.3.2	Matériel et méthodes.....	117
3.3.3	Résultats	119
3.3.4	Conclusions.....	131
4.	Exploration des effets métaboliques du PFOA	134
4.1	Etude de l'effet du PFOA sur la viabilité cellulaire.....	138
4.1.1	Objectif et principe général du test.....	138
4.1.2	Matériel et méthodes.....	139
4.1.3	Résultats et discussion	139
4.2	Etude des effets du PFOA sur les activités des transaminases et transpeptidases.....	141
4.2.1	Objectif et principe général du test.....	141
4.2.2	Matériel et méthodes.....	142
4.2.3	Résultats et discussion	143
4.3	Etude de l'effet du PFOA sur l'accumulation lipidique.....	145
4.3.1	Objectif et principe général du test.....	145
4.3.2	Matériel et méthodes.....	145
4.3.3	Résultats et discussion	146

4.4	Étude de la pénétration du PFOA et de sa métabolisation dans les cellules HepaRG.	150
4.4.1	Introduction	150
4.4.2	Matériel et méthodes.....	152
4.4.3	Résultats et discussion	156
4.4.4	Conclusions.....	163
4.5	Exploration des modulations métaboliques induites par le PFOA par métabolomique	164
4.5.1	Introduction	164
4.5.2	Matériel et méthodes.....	166
4.5.3	Résultats et discussion	169
4.5.4	Conclusion	187
5.	Discussion générale, conclusions et perspectives.....	189
5.1	Amélioration des protocoles pour limiter la variabilité dans les études métabolomiques.....	192
5.1.1	Importance d'un arrêt rapide du métabolisme cellulaire	192
5.1.2	Importance du choix des solvants pour la couverture du métabolome 194	
5.1.3	Limitation de la variabilité par l'utilisation d'un même passage cellulaire	197
5.1.4	Perspectives.....	198
5.2	Bilan et perspectives de l'étude métabolomique du PFOA	204

1. Introduction

1.1 Introduction générale et contexte en toxicologie

La toxicologie est une discipline scientifique vaste, qui étudie les effets néfastes d'une substance sur un organisme. Elle permet d'évaluer les dangers (effets) et les risques découlant d'une exposition à une substance chimique chez l'Homme, l'animal, ou dans l'environnement. Les recommandations pour la protection des travailleurs, des consommateurs et de l'environnement sont issues d'enquêtes scientifiques et d'évaluations des risques de ces substances (Gundert-Remy et al. 2015). La toxicologie recouvre un champ large de domaines scientifiques, englobant l'étude de la toxicité au niveau d'un organisme (effets directs, cancérogenèse), d'un tissu (par exemple l'hépatotoxicité), ou d'un système (toxicologie de la reproduction, immunotoxicologie...).

Une contamination alimentaire peut résulter du fait que des aliments contiennent des micro-organismes, des parasites ou bien des substances chimiques toxiques (pesticides, métaux lourds ...), qui peuvent rendre ces aliments dangereux à la consommation (Thompson and Darwish 2019). L'occurrence de contaminants chimiques dans les aliments peut être la conséquence d'une introduction volontaire (additifs alimentaires) ou involontaire (polluants de la chaîne alimentaire) de composés exogènes. D'autres contaminants alimentaires proviennent des matériaux d'emballages, migrant dans les aliments par simple contact (Mastovska 2013). Beaucoup de produits chimiques d'origine humaine peuvent être retrouvés dans l'environnement, en conséquence des rejets industriels et/ou domestiques, et peuvent contaminer toute la chaîne alimentaire jusqu'à l'Homme. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a reconnu la contamination alimentaire comme un enjeu mondial (World Health Organization 2015). En effet, l'OMS a constaté que les troubles de la santé potentiellement en lien avec une contamination des aliments constituent un problème majeur et planétaire. La variété des contaminants alimentaires détectés dans les chaînes alimentaires terrestres et aquatiques et dans l'environnement est très élevée et ne cesse d'augmenter, compte-tenu du

développement de la chimie à l'ère moderne. Les dangers relatifs à un grand nombre de ces contaminants sont souvent mal caractérisés. Cependant, il y a une prise de conscience en constante progression du public par rapport aux risques que font peser les contaminants alimentaires sur la santé. C'est pourquoi, on trouve dans la littérature de nombreuses études tentant de mieux cerner les dangers et les effets de ces composés sur la santé humaine, qui incluent : les effets cancérigènes, les effets toxiques classiques (toxicité générale, toxicité tissulaire), mais aussi des points d'impact révélés plus récemment, comme c'est le cas pour les perturbateurs endocriniens et ceux d'entre eux qui sont des perturbateurs métaboliques. Le système endocrinien regroupe l'ensemble des organes sécrétant des hormones comme la thyroïde, les ovaires, les testicules, l'hypophyse, etc. Ces organes libèrent des médiateurs chimiques (hormones) dans la circulation sanguine, pour réguler et orchestrer de nombreuses fonctions de l'organisme incluant le métabolisme et la régulation de l'homéostasie, la reproduction et le développement. Les perturbateurs endocriniens peuvent altérer le fonctionnement de ce système en interagissant avec la synthèse, la dégradation, le transport ou le mode d'action des hormones (EFSA 2013). Les perturbateurs endocriniens peuvent entraîner des effets néfastes sur un organisme ou sur ses descendants (Monneret 2017). Souvent, les effets des perturbateurs endocriniens sur la santé sont initiés par une altération du développement consécutive à une exposition en période périnatale (exposition *in utero* et/ou durant la période post-natale) (Street and Bernasconi 2020). Certains d'entre eux sont aujourd'hui également soupçonnés d'être des "perturbateurs métaboliques" (Metabolic Disruptors) pouvant avoir effets pérennes sur les processus métaboliques de l'organisme exposé, là encore le plus souvent suite à une exposition en période périnatale. Par exemple, certains récepteurs nucléaires participent à la régulation du métabolisme énergétique et contribuent à l'homéostasie cellulaire lorsqu'ils sont physiologiquement activés par leurs ligands naturels comme par exemple une régulation du glucose ou lipidique. Il

existe certains contaminants alimentaires ou environnementaux capables de se lier à ces récepteurs nucléaires comme par exemple le bisphénol A (BPA) sur le récepteur aux œstrogènes ER α (Cabaton et al. 2011; Xu et al. 2014) ou le tributylétain (TBT) sur le récepteur PPAR α (Chamorro-Garcia et al. 2017). Une activation d'un ou plusieurs de ces récepteurs nucléaires par ce type de composé, est susceptible d'entraîner des effets délétères répondant ainsi à la définition de perturbateur métabolique (Heindel and Blumberg 2019). Les perturbateurs métaboliques peuvent par exemple potentialiser le développement de l'obésité, du diabète de type 2 et/ou d'une stéatose hépatique non alcoolique. L'exposition (notamment périnatale) à ces perturbateurs métaboliques pourrait conduire à une modulation pérenne des processus biochimiques, avec des conséquences à long terme sur le métabolisme. Ces perturbateurs métaboliques sont, comme les autres perturbateurs endocriniens, suspectés d'agir à de « faibles doses » pouvant être définies en toxicologie comme une concentration inférieure à celle habituellement utilisée dans les protocoles d'évaluations toxicologiques traditionnelles. Plus généralement, une faible dose est une concentration pour une substance chimique donnée à des valeurs proches de celles qui ont été mesurées dans la population humaine générale (Vandenberg et al. 2012). Compte tenu de ces éléments, il est nécessaire de pouvoir disposer d'approches toxicologiques adaptées, indispensables pour caractériser les effets attendus chez l'Homme de ces molécules, y compris pour de faibles doses d'exposition. Les approches anatomiques, histologiques ou biochimiques classiquement utilisées en toxicologie manquent parfois de sensibilité pour mettre en évidence les effets à faibles doses des perturbateurs métaboliques et endocriniens (Guignard 2016), notamment lorsqu'il s'agit de caractériser la modulation métabolique. Une des voies possibles pour la caractérisation des effets des perturbateurs métaboliques est l'utilisation d'approches "omiques" telles que la transcriptomique, la protéomique ou la métabolomique, qui peuvent être d'une grande utilité pour mettre en évidence ce type d'effets (Cabaton

et al. 2013; Wadia et al. 2013; Maertens et al. 2017; Franco et al. 2020). Ces approches commencent aujourd'hui à être utilisées dans ce domaine. La métabolomique est un outil puissant pour étudier les effets d'un toxique (ou d'un mélange de toxiques) dans un organisme ou un système biologique (Ramirez et al. 2013) car elle permet d'explorer les modifications de l'ensemble des petites molécules ("métabolome") de ce système, induites par l'exposition à une substance (ou à un mélange de substances). Récemment, de vastes projets ont été financés par l'Union Européenne (UE) visant à mieux évaluer le potentiel de modulateur métabolique et endocrinien de contaminants environnementaux et alimentaires, notamment sur la base d'approches métabolomiques, avec le "cluster" Horizon 2020 EURION (<https://eurion-cluster.eu/>) (EURION 2020; Legler et al. 2020). A ce jour, la métabolomique n'est pour le moment pas utilisée par les agences d'évaluation du risque (EFSA, ECHA, ANSES...) ou dans les procédures standardisées visant à caractériser les effets toxiques d'un composé. Cependant, les approches de métabolomique sont de plus en plus utilisées pour parvenir à identifier les effets des composés chimiques, y compris chez l'Homme (Cabaton et al. 2018; Salihovic et al. 2019; Franco et al. 2020). Bien que les études *in vivo* (sur modèles animaux) soient encore essentielles pour caractériser la toxicité d'un ou plusieurs composés d'intérêt, un des challenges en toxicologie est la limitation de l'utilisation des animaux, qui pose aujourd'hui de nombreux problèmes éthiques (Kandárová and Letašiová 2011). Une des solutions est le développement de modèles *in vitro* performants permettant d'être prédictifs des effets d'un composé d'intérêt chez l'Homme (Ramirez et al. 2013). Le développement de modèles hépatiques est d'un intérêt particulier dans le cadre des perturbateurs métaboliques. En effet, le foie joue un rôle important dans l'organisme, en ce qui concerne les processus de détoxification d'agents contaminants exogènes (xénobiotiques) grâce à de nombreuses réactions enzymatiques ayant pour but de faciliter l'élimination de ces xénobiotiques par l'organisme. Ces mêmes enzymes contribuent également pour une

grande partie à tous les processus d'anabolisme et de catabolisme endogènes assurant le bon fonctionnement de l'organisme. Pour cette raison, leur modulation par les composés exogènes est l'un des mécanismes possibles de l'action des perturbateurs endocriniens et métaboliques sur le métabolisme endogène. Pour ces raisons, il est nécessaire que les systèmes *in vitro*, de plus en plus utilisés en toxicologie, soient suffisamment représentatifs des processus biochimiques à l'œuvre dans les organismes vivants, notamment sur le plan du métabolisme. De nombreux modèles hépatiques *in vitro* ont été développés pour les études de toxicologie au cours des dernières décennies, incluant les hépatocytes primaires humains et des lignées cellulaires comme les cellules HepaRG, HepG2, Fa2N-4, ou Hep3B (Soldatow et al. 2013). Bien que les hépatocytes primaires humains soient intuitivement des modèles cellulaires assez représentatifs pour étudier les effets hépatiques d'un composé chez l'Homme, ils possèdent aussi une très forte variabilité liée aux caractéristiques du donneur, incluant par exemple le sexe, l'âge, la génétique et le mode de vie (tabagisme, consommation d'alcool, médication...). Cette variabilité est problématique lors d'une étude métabolomique étudiant les effets à faible concentration d'un composé d'intérêt, car elle peut masquer les effets de ce composé. C'est pourquoi de nombreuses études métabolomiques utilisent des lignées cellulaires hépatiques plutôt que des hépatocytes primaires. Bien que ces lignées cellulaires puissent s'éloigner des caractéristiques phénotypiques d'un tissu hépatique sain, la variabilité provenant du modèle est considérablement minorée, et certaines lignées conservent l'expression de beaucoup de fonctions spécifiques du foie ainsi que de nombreux cytochromes P450, récepteurs nucléaires, enzymes de phase II et transporteurs membranaires. C'est notamment le cas de la lignée cellulaire HepaRG. Plusieurs études ont par exemple utilisé la métabolomique dans le cadre d'une étude toxicologique sur des lignées cellulaires comme les cellules HepaRG (Cuykx et al. 2018), ou les cellules HepG2 (Cabaton et al. 2018).

Dans la suite de ce manuscrit, la métabolomique et particulièrement son application sur des modèles cellulaires sera détaillée afin de comprendre le développement de cette technologie récente dans différents domaines scientifiques et particulièrement en toxicologie alimentaire.

1.2 La métabolomique : un outil pertinent pour étudier les effets métaboliques des contaminants alimentaires

1.2.1 Définition et domaines d'application

On appelle « approches omiques », l'ensemble des technologies visant à caractériser et à comprendre le fonctionnement biologique d'ensembles vivants complexes tels que des individus, des organes, des cellules, etc. Les approches omiques couramment utilisées pour caractériser un système biologique sont la génomique, la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique (Idle and Gonzalez 2007). Dans un organisme, l'expression des gènes passe par une étape de transcription où l'ADN contenant les gènes d'un organisme est transcrit en ARN messager. L'étape de traduction permet ensuite de convertir l'information contenue dans l'ARN messager pour la production de protéines (Taylor 2006). Certaines de ces protéines, notamment les enzymes, jouent alors un rôle crucial dans les réactions intracellulaires, produisant (et consommant) des petites molécules : les « métabolites ». On appelle « métabolisme », l'ensemble des réactions biochimiques qui se déroulent à l'intérieur d'un être vivant. Ces réactions englobent, les processus de biosynthèse (anabolisme), d'utilisation (par exemple pour la production d'énergie) et de dégradation (catabolisme) des métabolites. Elles permettent à un organisme de se maintenir en vie, de se reproduire, de se développer et de s'adapter aux variations environnementales. La génomique vise à caractériser l'ensemble des gènes d'un organisme, qu'on appelle le génome, la transcriptomique permet de définir l'ensemble des transcrits ou ARN messager d'un organisme (transcriptome) ainsi que leur niveau d'expression et la protéomique cherche à caractériser l'ensemble des protéines d'un système biologique, désigné comme le protéome.

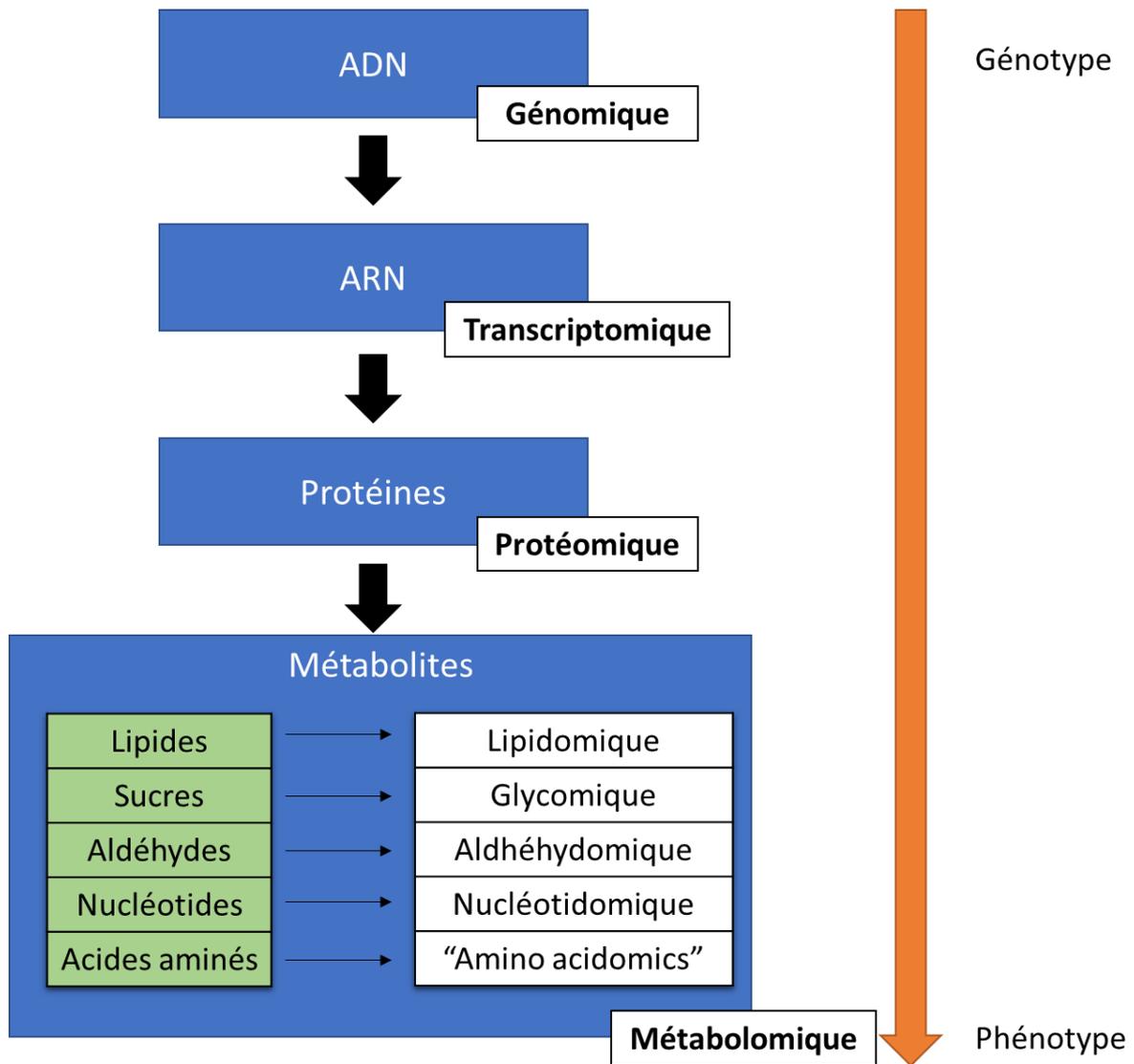


Figure 1 : Schéma adapté de la publication Jurowski et ses collaborateurs (Jurowski et al. 2017) représentant la place de la métabolomique dans la cascade des technologies omiques.

La métabolomique englobe l'ensemble des démarches analytiques permettant d'aboutir à la caractérisation, la plus exhaustive possible, des métabolites endogènes présents dans un système biologique, que l'on désigne sous le nom de « métabolome » (Klassen et al. 2017). Comme représenté sur la figure 1, la métabolomique se positionne ainsi comme la technologie omique la plus proche du phénotype (Tan et al. 2016). En effet, les données générées par la métabolomique reflètent à la fois les conséquences de l'expression du génome, du transcriptome et du protéome. Pour ces raisons, la métabolomique est la technologie omique la plus adaptée pour décrypter la réponse fonctionnelle d'un organisme à des modifications génétiques, environnementales, pathologiques, ou encore face à un stimulus externe (Turi et al. 2018). Comme représenté dans la figure 1, il existe aujourd'hui en métabolomique beaucoup de technologies omiques spécialisées sur une catégorie (au sens de la chimie structurale) de métabolites, comme la « lipidomique » pour la mesure des différentes classes de lipides ou « la nucléotidomique » pour la mesure des acides nucléiques par exemple.

Les métabolites sont des petites molécules de faible poids moléculaire, généralement inférieur à 1500 dalton, tels que les acides aminés, les acides organiques, les sucres, les acides gras, les phospholipides, etc. Le nombre de métabolites présents dans un organisme vivant est difficile à évaluer et dépend de l'organisme étudié. Plus de 110 000 molécules sont référencées dans les bases de données telles que la Human Metabolome Database (Wishart et al. 2018). Ce chiffre comprend les métabolites directement liés aux activités enzymatiques codées par le génome humain, c'est-à-dire les métabolites endogènes, mais aussi ceux qui proviennent des aliments, des médicaments et du microbiote, c'est-à-dire des métabolites exogènes. Certaines études ont tenté une reconstruction du réseau métabolique humain regroupant l'ensemble des métabolites endogènes connus chez l'Homme. Plus de 4 000 métabolites endogènes ont pu être regroupés (Brunk et al. 2018). Bien que le terme « métabolomique » n'ait jamais été

utilisé avant le 21^{ème} siècle, on trouve des traces d'études métabolomiques bien avant cette date. C'est en 1951 que Roger Williams a décrit le concept de "profil métabolique" pour la première fois et a proposé que les individus aient leur propre "profil métabolique" caractérisé par leurs fluides corporels (Williams 1951). Le concept de profilage métabolique a été introduit par la suite en 1971 avec la première utilisation de la Spectrométrie de Masse (SDM) pour quantifier un plus grand nombre de métabolites (Horning and Horning 1971). En 1984, l'utilisation de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) en métabolomique a été initiée par Nicholson et ses collaborateurs par l'analyse de fluides corporels, avec la mise en évidence de biomarqueurs chez des patients diabétiques (Nicholson et al. 1984). Le terme « métabolome » a été utilisé pour la première fois en 1998 afin de désigner l'ensemble des métabolites d'un organisme dont les concentrations varient en fonction de la suppression ou de la surexpression d'un gène (Oliver et al. 1998). Le terme de « métabonomique » est apparu en 1999 afin de définir l'analyse quantitative de la réponse métabolique d'un système vivant face à un stimulus physiopathologique ou à une modification génétique (Nicholson et al. 1999). Le terme « métabolomique » apparaît pour la première fois en 2001 (Fiehn 2001) où il est défini comme l'analyse exhaustive et quantitative de tous les métabolites d'un système biologique. Actuellement, la métabolomique est de plus en plus utilisée. Pour illustration, il a été constaté une augmentation exponentielle au fil du temps du nombre de publications concernant la métabolomique (Deidda et al. 2015).

La métabolomique permet d'identifier et de quantifier les métabolites d'un organisme étudié de manière globale ou de manière ciblée sur certaines molécules d'intérêt. Ainsi, les variations du métabolome d'un organisme dans des conditions différentes peuvent aider à comprendre l'influence d'un stimulus sur le phénotype. La détection de certains métabolites peut aussi jouer un rôle important dans le diagnostic précoce de maladies (Clish 2015).

Par conséquent, la métabolomique peut être appliquée à de nombreux domaines scientifiques tels que la recherche clinique (Kennedy et al. 2018), la découverte ou le développement de médicaments (Tuyiringire et al. 2018), la nutrition (Koulman and Volmer 2008), et la toxicologie, avec notamment l'étude des perturbateurs métaboliques (Ramirez et al. 2013). De fait, le nombre d'articles publiés entre 2005 et 2014 en rapport avec la métabolomique a été multiplié par 10 avec un pic de publications supérieur à 7000 en 2019 (voir figure 2).

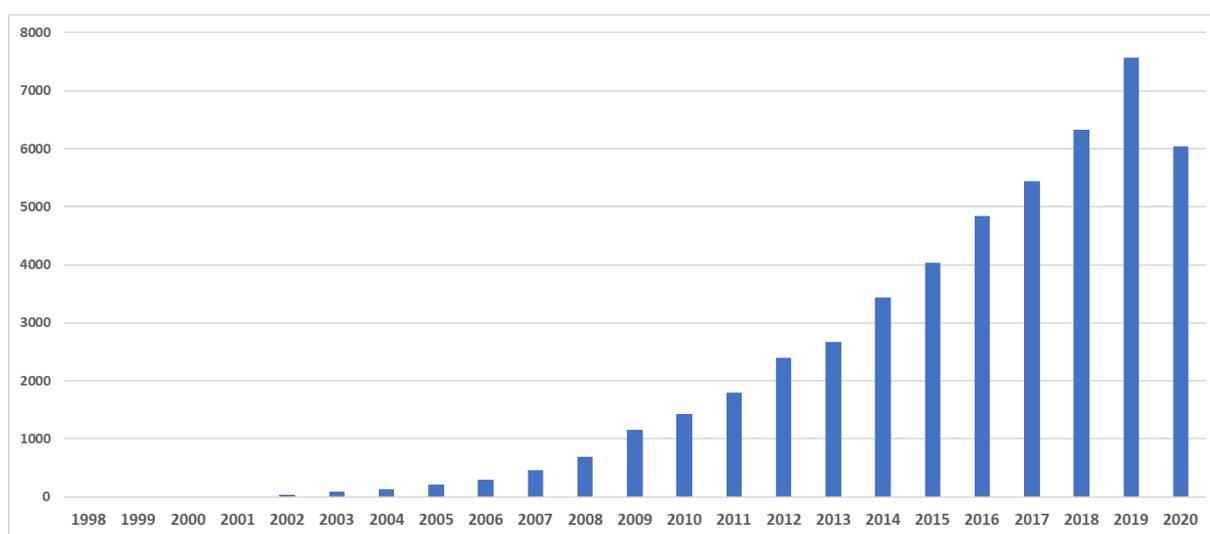


Figure 2 : Nombre de publications liées au terme « metabolomics » sur la plateforme de publication Pubmed entre 1998 et 2020.

1.2.2 Les stratégies et outils analytiques en métabolomique

En pratique, la métabolomique représente un défi analytique important. Contrairement aux méthodes génomiques et protéomiques, elle vise à caractériser des molécules qui ont des propriétés physico-chimiques très différentes. Par exemple, la polarité différente des acides aminés et des acides gras peut poser des problèmes pour une mesure simultanée de ces composés (Villaret-Cazadamont et al. 2020). En conséquence, il est impossible d'utiliser une seule et même technique analytique pour mesurer l'ensemble du métabolome et il peut s'avérer utile de combiner plusieurs

technologies afin de couvrir la plage la plus étendue possible de métabolites, et donc de renseigner, de la façon la plus exhaustive possible, l'expression du métabolome dans un échantillon donné. Ainsi, les plateformes de métabolomique adoptent généralement la stratégie de réaliser plusieurs analyses différentes pour les différents types de composés, selon leurs caractéristiques physico-chimiques. Des procédures spécifiques sont développées pour chaque groupe de métabolites et chaque analyse est optimisée (Clish 2015).

Pour mesurer les métabolites dans un système vivant, deux principales techniques sont utilisées, la SDM et la RMN. Ces deux techniques analytiques sont très complémentaires et chacune possède des avantages et des inconvénients (Marshall and Powers 2017) (voir tableau 1). Il existe deux stratégies analytiques pour les études de métabolomique. La première est **la métabolomique non-ciblée**, aussi appelée métabolomique "globale", dont l'objectif principal est l'analyse de toutes les molécules mesurables dans un échantillon (Schrimpe-Rutledge et al. 2016). Les signaux obtenus ne sont pas préalablement identifiés et nécessitent donc une annotation a posteriori, avec l'utilisation de bibliothèques en ligne ou produites en interne par le laboratoire effectuant l'analyse. La métabolomique non ciblée permet d'observer les modulations du métabolome sur une large gamme de métabolites et sans a priori. Contrairement à la métabolomique non ciblée, **la métabolomique ciblée** consiste en la mesure de groupes connus de métabolites préalablement caractérisés et annotés par des bases de données. Grâce à l'utilisation de standards internes, l'analyse métabolomique ciblée peut être quantitative (obtention de concentrations) ou semi-quantitative (abondances relatives). Le fait d'avoir des métabolites identifiés permet de pouvoir directement étudier les voies biochimiques auxquelles ils appartiennent et réaliser des interprétations mécanistiques (Roberts et al. 2012).

Tableau 1 : Avantages et inconvénients de la RMN et de la SDM.

	RMN	SDM
Avantages	<ul style="list-style-type: none">- Peu de manipulations pré-analytiques- Technique non destructrice- Bonne répétabilité- Technique directement quantitative	<ul style="list-style-type: none">- Très sensible- Faible quantité d'échantillons requise- Technique séparative simplifiant l'analyses des spectres
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none">- Manque de sensibilité- Pas de technique séparative en amont donnant des spectres complexes- Grande quantité d'échantillons requise- Technique onéreuse	<ul style="list-style-type: none">- Technique destructrice- Beaucoup d'effets matrices diminuant la reproductibilité- Technique onéreuse

a. La résonance magnétique nucléaire

Dans une molécule, les noyaux des atomes sont constitués de protons et de neutrons, leur somme est appelée nucléons. Certains noyaux peuvent ainsi posséder un nombre de protons et de nucléons impairs leur permettant d'avoir ce que l'on appelle un moment magnétique nucléaire non nul, c'est-à-dire qu'ils peuvent se comporter comme des aimants et être orientés dans une direction en présence d'un champ magnétique. La RMN permet d'observer le phénomène de résonance magnétique des noyaux pouvant être induit uniquement sur des noyaux possédant un moment magnétique nucléaire non nul tel que les noyaux ^1H , ^{13}C , ^{15}N ou ^{31}P (Bothwell and Griffin 2011). Lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique et lorsque ces atomes reçoivent une onde radiofréquence, les noyaux peuvent passer d'un état stable à un état excité. Lorsque l'émission de l'onde radiofréquence s'arrête, le noyau retourne à son état stable en émettant une fréquence pouvant être détectée pour former le signal RMN. Cette fréquence émise varie en fonction du nuage électronique du noyau et du moment magnétique des noyaux voisins (Dona et al. 2016). Ainsi, une molécule peut générer un grand nombre de signaux et chaque molécule va posséder ses

propres fréquences en fonction de sa structure chimique. Les fréquences mesurées pour une molécule seront aussi proportionnelles à la quantité de cette molécule dans l'échantillon. Le nombre de molécules présentes dans un échantillon peut être très élevé. Ceci va générer des spectres très denses en métabolomique par RMN, détaillant simultanément les fréquences obtenues pour des dizaines ou des centaines de molécules. Les aires des pics obtenus sur un spectre RMN peuvent alors être comparées entre plusieurs échantillons (Lindon et al. 2006). Pour cela, plusieurs choix analytiques sont possibles :

Les analyses ciblées quantitatives nécessitent l'utilisation d'un standard interne de concentration connue non présent dans la matrice d'étude. Souvent l'acide triméthylsilylpropanoïque (TSP) est utilisé car il possède un faible déplacement chimique et est isolé des autres pics détectés dans l'échantillon. Il est donc facilement intégrable et permet aussi de calibrer le spectre RMN. Afin d'obtenir la quantification absolue d'un métabolite dans un échantillon, la molécule ciblée doit être validée par une base de données interne. En effet, le nombre d'atomes représentés dans le pic de la molécule ciblée doit être connu afin de remonter à sa concentration. Le problème en RMN est qu'il est possible d'avoir une superposition de pics provenant de métabolites différents. Cette superposition peut compliquer l'intégration, il faut donc s'assurer que le pic ciblé provient d'un seul et même métabolite. Il est aussi possible de faire des analyses ciblées avec une quantification relative sans l'ajout d'un standard interne ne donnant pas accès à la concentration d'un composé ciblé. C'est-à-dire que l'aire d'un pic ou d'un massif de pics peut être aussi comparée entre plusieurs échantillons.

- Pour une analyse non ciblée en RMN, il est possible de découper et d'intégrer l'ensemble d'un spectre afin de comparer les aires de chaque zone entre plusieurs spectres. On appelle « bucketing fixe »

une découpe du spectre de manière continue et régulière générant un grand nombre de variables. Au contraire, le « bucketing variable » est une découpe du spectre dans des zones spécifiques généralement large afin d'intégrer l'ensemble d'un massif de pics.

b. La spectrométrie de masse

En SDM, les molécules présentes dans un échantillon sont ionisées, c'est-à-dire que l'on fait subir à ces molécules des processus amenant à une ionisation (positive ou négative). Le principe de base d'un spectromètre de masse consiste ensuite à mesurer le rapport masse/charge (m/z) des espèces ionisées (Alonso et al. 2015). Classiquement un spectromètre de masse est composé d'un système d'injection de l'échantillon, d'une source d'ionisation, d'un analyseur et d'un détecteur (voir figure 3).

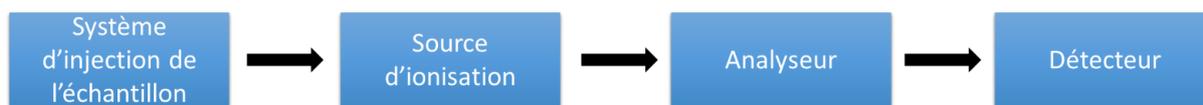


Figure 3 : Structure simplifiée d'un spectromètre de masse associé à des techniques chromatographiques.

- Contrairement à la RMN, la SDM est généralement associée à des techniques séparatives de chromatographie permettant de mieux gérer la grande quantité de molécules arrivant dans l'appareil (Pitt 2009). En effet, pour des échantillons complexes (non purifiés) l'absence de chromatographie (injection directe) en amont rendrait l'analyse des spectres très difficiles, tous les analytes étant alors observés sur le même spectre. La chromatographie va permettre d'ajouter une dimension de séparation supplémentaire sur les métabolites par rapport à leurs propriétés physicochimiques. Ainsi l'analyse d'un échantillon avec un système de chromatographie va permettre de générer un chromatogramme où des milliers de spectres de masses sont associés à un temps de rétention. Parmi les

techniques de chromatographie utilisées, on retrouve le plus souvent la chromatographie en phase gazeuse, la chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) ou ultra performance (UPLC) ou encore l'électrophorèse capillaire. En métabolomique, l'UPLC permet d'obtenir un meilleur ratio signal/bruit et est généralement favorisée. La chromatographie en phase gazeuse qui permet aussi d'ioniser des molécules qui ne le seraient pas forcément en chromatographie en phase liquide est aussi utilisée. Dans un système chromatographique liquide, on appelle phase stationnaire la partie solide capable de rentrer en interaction avec les métabolites en fonction de leur polarité en vue de leur séparation. On distingue les phases stationnaires avec interactions hydrophiles (HILIC) qui vont retenir les métabolites polaires, et celles avec des interactions hydrophobes (à phase inverse) qui vont retenir les métabolites apolaires. La phase mobile correspond aux différents solvants utilisés pour acheminer les métabolites jusqu'à l'appareil. La nature des solvants utilisés influence également la séparation des métabolites de l'échantillon. Un gradient de polarité est réalisé avec ces solvants afin de récupérer les métabolites en cours de séparation dans la phase stationnaire et élués au fur et à mesure. D'après les observations réalisées dans la bibliographie, l'utilisation de la chromatographie liquide est favorisée pour les analyses métabolomiques (Aldana et al. 2020). Beaucoup de plateformes analytiques se sont spécialisées dans la mesure de certains composés spécifiques et les méthodes analytiques développées et optimisées varient en fonction des plateformes. Il existe de nombreuses sources d'ionisation en SDM, on distingue les modes d'ionisations dures et douces. Les sources dures, telles que l'impact électronique, fournissent une grande quantité d'énergie et aboutissent à une fragmentation partielle ou totale des molécules. Les modes d'ionisations plus doux, telles que l'électrospray (ESI) ou la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI), permettent

de ne pas dégrader la molécule de départ. En métabolomique, les techniques d'ionisations douces sont souvent préférées afin de ne pas détruire les métabolites d'un échantillon (Gowda and Djukovic 2014). La chromatographie en phase liquide est généralement associée avec une source d'ionisation electrospray pour une étude métabolomique. Cependant, l'utilisation de la chromatographie gazeuse utilisant principalement l'impact électronique (EI) s'avère parfois très complémentaire pour la mesure de certaines catégories de métabolites.

- Les performances de l'analyseur d'un spectromètre de masse sont évaluées au travers de sa capacité résolutive. La résolution d'un analyseur est sa capacité à séparer des ions de rapport m/z proches. On peut alors distinguer des analyseurs à basse résolution (pouvoir de résolution de l'analyseur $< 10\ 000$), tels que des analyseurs quadripolaires ou à piège à ions, et des analyseurs à haute résolution (pouvoir de résolution de l'analyseur $> 10\ 000$), tels que des analyseurs à temps de vol ou à trappe orbitaire (Orbitrap) (Mann and Kelleher 2008). En métabolomique, la résolution est souvent privilégiée afin de distinguer les molécules ayant une masse très proche, par exemple des isotopes naturels d'une molécule. Elle permet aussi un accès direct à la formule brute d'un composé.
- Le détecteur permet de convertir les données mesurées par l'analyseur en courant électrique qui pourra ensuite être représenté dans un spectre de masse.

Comme pour la RMN, plusieurs choix analytiques sont possibles en SDM :

- Les analyses ciblées quantitatives vont nécessiter la création d'une gamme étalon lors de l'analyse des échantillons avec l'utilisation de standards externes. En SDM, chaque métabolite peut s'ioniser plus ou moins facilement. C'est pourquoi, pour une quantification absolue, la molécule utilisée en tant que standard dans la gamme étalon doit être disponible dans le commerce. Pour une quantification absolue plus précise, il est aussi possible d'utiliser des molécules marquées au ^{13}C pour corriger les variations générées par l'appareil de mesure. Des analyses ciblées non quantitatives en SDM sont aussi réalisées avec l'obtention d'une quantification relative. Pour ce type d'analyse, une gamme étalon externe n'est pas nécessaire. Une valeur d'intégration ou un ratio d'aires est alors obtenu pour chaque composé ciblé.
- Pour une analyse non ciblée en SDM, la production des données passe par plusieurs étapes successives incluant la détection des différents pics chromatographiques, leur alignement en termes de temps de rétention (pour corriger les déviations éventuelles intervenant au cours des séquences d'analyse) et leur intégration. Des étapes de filtration des données sont ensuite nécessaires afin de limiter le nombre de faux positifs pouvant être générés lors de l'analyse. Ces faux positifs sont généralement des variables sans intérêt biologique comme du bruit de fond analytique. L'identification des variables intégrées est réalisée a posteriori à l'aide de bases de données.

1.2.3 Quels sont les étapes clés dans une analyse métabolomique ?

Une étude métabolomique se déroule en plusieurs étapes, on appelle « workflow métabolomique » les étapes classiques et successives réalisées pour l'analyse des échantillons en métabolomique allant du design expérimental jusqu'à l'interprétation biologique des résultats (voir figure 4). Chaque étape de ce workflow peut avoir une influence sur la qualité des résultats obtenus et impacter par la suite l'interprétation des résultats. Notamment, un point critique essentiel à prendre en compte lors d'une analyse métabolomique est la variabilité qui peut être introduite à chaque étape et qui doit être réduite au maximum. L'étape de préparation des échantillons est un point particulièrement critique, qui peut être une source importante de variabilité (Cuperlović-Culf et al. 2010) : ce point sera abordé plus en détail dans la partie 3.1.1 de ce manuscrit.

Il existe de nombreux modèles d'étude utilisés en métabolomique et le workflow métabolomique peut varier en fonction du modèle d'étude utilisé, notamment en ce qui concerne l'étape de préparation des échantillons. Dans la suite de cette partie, les points critiques du workflow seront détaillés pour l'application de la métabolomique sur une lignée cellulaire adhérente, en prenant l'exemple de la lignée cellulaire hépatique HepaRG (qui sera présentée dans la partie 2.1), qui est le modèle utilisé lors de cette thèse.

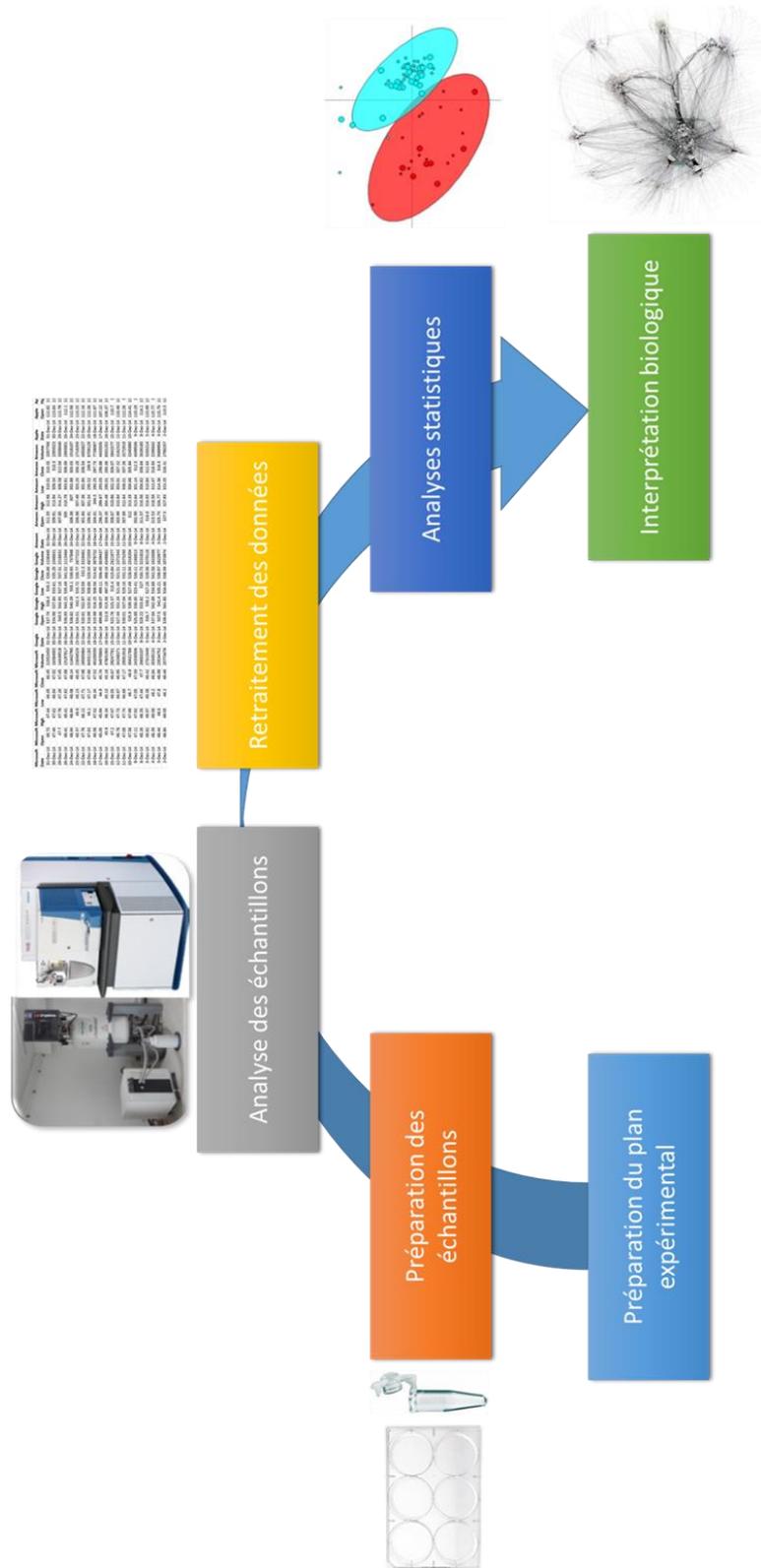


Figure 4 : Schéma résumant les différentes étapes du workflow métabolomique.

a. La préparation du plan expérimental

La préparation du plan expérimental est une étape cruciale pour le bon déroulement d'une étude métabolomique. Certains choix sont à définir au préalable, comme le modèle utilisé pour la pertinence de l'étude (modèle hépatique, modèle rénal, etc.), les stratégies analytiques (ciblée, non ciblée) et les outils analytiques utilisés (RMN, SDM) lors de l'étude qui vont conditionner les autres étapes du workflow telles que la préparation, l'analyse des échantillons et le retraitement des données. Dans le cas d'un modèle cellulaire, c'est à cette étape que l'on définit les concentrations d'exposition des cellules à un composé d'intérêt, ou encore que l'on estime la quantité de cellules nécessaires afin de réaliser l'expérience. Il est aussi important de prévoir des échantillons contrôles, positifs et négatifs permettant la bonne interprétation des données par la suite. De plus, il est particulièrement important de prévoir un nombre d'échantillons suffisant, permettant par la suite de pouvoir correctement interpréter les résultats statistiques. Des tests de puissance statistique permettent d'estimer le nombre d'échantillons requis afin de pouvoir tirer des conclusions sur un potentiel effet biologique, par exemple à partir d'une étude pilote. Cette étape doit pouvoir prendre en compte la variabilité inhérente aux mesures.

Cette étape de préparation du plan expérimental ne doit pas être négligée, car elle détermine ensuite la bonne interprétation des données et les conclusions que l'on tire des observations. Il est souvent conseillé de passer par des expériences pilotes pour fixer toutes les conditions d'une étude pour qu'il n'y ait pas de problème au moment de l'expérience.

b. La préparation des échantillons

L'objectif de cette étape est de générer des échantillons analysables en SDM ou RMN en étant le plus reproductible possible, c'est-à-dire en limitant le plus possible l'introduction de biais pouvant modifier l'intensité du signal analytique d'un métabolite. Le but final en métabolomique est d'observer les métabolites mesurés de la manière la plus représentative possible pour le système biologique étudié, sur le plan qualitatif et quantitatif. Cependant, c'est cette étape de préparation des échantillons qui contribue le plus souvent à l'introduction de variabilité (León et al. 2013). Dans le cas d'un modèle cellulaire, il existe de nombreux points critiques pouvant introduire de la variabilité lors de l'analyse, les principaux points critiques qu'il est possible d'identifier sont les suivants :

- L'ensemble des étapes d'arrêt du métabolisme cellulaire doit être réalisée rapidement. En effet, certains métabolites peuvent subir des processus de dégradation ou de modification enzymatique très rapides, ce qui peut conduire à des mesures peu représentatives de l'état des cellules au moment de l'expérience si l'arrêt du métabolisme n'est pas réalisé de manière assez rapide. Une attention particulière doit par conséquent être portée sur le protocole d'arrêt du métabolisme. Il existe de nombreux protocoles qui diffèrent notamment au niveau de la vitesse d'exécution, des solvants utilisés, des méthodes de lavage et de récupération des cellules. Ces différentes méthodes, utilisées pour l'arrêt du métabolisme cellulaire, seront détaillées dans la partie 3.1.
- Les cellules sont généralement cultivées et multipliées dans des flasques. Cependant les échantillons pour la métabolomique sont généralement produits à partir de plaques avec des puits de plus faibles volumes, afin que la quantité de cellules soit la même dans chaque puits de l'expérience. De fait, il est

indispensable que chaque réplica soit produit à partir d'une quantité de cellules la plus proche possible, puisqu'on procédera *in fine* à la comparaison des intensités relatives pour chaque analyte/métabolite. La précision du pipetage de la suspension cellulaire dans cette nouvelle plaque est pour la même raison également essentielle pour la reproductibilité des résultats, comme pour toute expérimentation.

- La séparation des métabolites exogènes provenant du milieu extracellulaire de traitement, et des métabolites endogènes provenant des cellules est aussi une étape importante. Certains métabolites tels que les acides aminés, fortement concentrés dans les milieux de culture, sont aussi présents dans les cellules. Une mauvaise séparation peut donc aboutir à une mesure faussée.

c. L'analyse des échantillons

Il existe deux principaux outils analytiques pour faire de la métabolomique, la RMN et la SDM. Chaque technique possède des avantages et des inconvénients, tels que détaillés précédemment dans la section 1.2.2. Lors de l'étape d'analyse des échantillons, plusieurs biais peuvent être introduits. Plusieurs paramètres, tels que le champ magnétique (pour la RMN) ou la qualité d'ionisation des appareils ainsi que la qualité des colonnes HPLC (pour la SDM) peuvent varier légèrement d'une expérience à une autre. Ceci peut générer de la variabilité.

d. Le retraitement des données

L'objectif de l'étape de retraitement des données consiste à convertir le signal dit "brut" (obtenu directement en sortie de l'appareil de mesure) en valeurs chiffrées. Cette étape passe par des méthodes d'intégration de pics qui sont différentes en fonction de l'appareil de mesure utilisé. Il existe aussi de nombreux logiciels différents pour le retraitement des données en métabolomique. TopSpin, Nmrprocflow ou Amix pour la RMN, Tracefinder, Masslinx, Xcalibur, XCMS, Mzmine, MSdial peuvent par exemple être utilisés pour la spectrométrie de masse. Ces logiciels possèdent parfois des algorithmes d'intégrations différents, ce qui aboutit à des variations dans les valeurs d'intégration obtenues ou dans la détection de certaines variables (Hao et al. 2018).

e. Les analyses statistiques

Les analyses statistiques ont pour but de mettre en évidence les différences observées entre deux conditions, pour rechercher si cette différence est significative. Si elle l'est, alors il est possible d'identifier quels sont les métabolites responsables d'une discrimination entre deux groupes et/ou les conditions d'exposition. Il s'agit des métabolites dont la concentration varie de manière significative entre les différentes conditions, contribuant à la distinction des groupes. On distingue les analyses multivariées qui sont particulièrement utilisées en métabolomique non ciblée, et les analyses univariées utilisées pour les analyses de métabolomique ciblée et non ciblée.

Les analyses univariées sont des analyses individuelles de chaque variable, elles sont particulièrement utilisées lorsqu'il est nécessaire de comparer deux ou plusieurs groupes d'observations entre eux. Pour cela, des tests paramétriques tels que le test de Student et l'ANOVA sont couramment appliqués, à condition que les hypothèses de normalité des valeurs soient vérifiées. Dans les cas où la normalité des données ne peut être confirmée, des tests non paramétriques sont alors appliqués (Alonso

et al. 2015). Dans la plupart des études métabolomiques, un grand nombre de variables sont analysées simultanément et la probabilité de trouver un résultat statistiquement significatif par hasard est élevée (faux positif). Afin de contrôler ce problème de tests multiples, plusieurs méthodes de correction sont disponibles telles que la correction FDR (false discovery rate).

Contrairement aux méthodes univariées, les méthodes d'analyses multivariées prennent en compte simultanément toutes les variables mesurées lors d'une analyse et tentent de construire des modèles représentant leur comportement au sein de chaque groupe d'échantillon. Généralement, les analyses multivariées sont utilisées en présence de larges jeux de données, comme c'est le cas en métabolomique où le nombre de variables est largement supérieur au nombre d'observations. Les méthodes multivariées peuvent être classées en deux groupes : les méthodes supervisées et les méthodes non supervisées. Dans les méthodes d'analyse non supervisées, les modèles sont construits sans tenir compte du groupe d'appartenance des échantillons étudiés. L'analyse en composante principale (ACP) est la méthode non supervisée la plus couramment utilisée dans les études métabolomiques. Au contraire, dans les méthodes supervisées, les groupes d'appartenance des échantillons sont utilisés afin d'identifier les variables qui sont davantage associées à une condition de l'expérience. L'analyse discriminante par régression des moindres carrés partiels (PLS-DA) est l'une des méthodes supervisées les plus utilisées en métabolomique. Ce type d'analyse permet d'identifier des variables discriminantes, mais également de construire un modèle statique qui peut aussi être utilisé pour prédire a posteriori l'appartenance d'une observation à un groupe. L'analyse discriminante par régression des moindres carrés partiels orthogonales (OPLS-DA) est aussi une méthode supervisée. Lors d'une OPLS-DA, on extrait la variabilité non liée au facteur biologique d'intérêt (c'est-à-dire la variabilité orthogonale). Cette méthode est particulièrement pertinente lors d'une étude métabolomique possédant

généralement une forte variabilité non liée aux facteurs d'intérêts. Ces modèles statistiques doivent être validés par des tests de permutation et de validation croisée.

f. L'interprétation biologique

A la suite d'une analyse statistique, les valeurs obtenues à la suite des intégrations (aires, concentrations, abondances relatives) peuvent être significativement différentes pour certaines variables et entre différentes conditions. Lorsque des métabolites dont les concentrations ou niveaux de détection variant de manière significative sont identifiés, les réseaux métaboliques peuvent aider à comprendre quelles voies métaboliques sont affectées dans les conditions étudiées. Les réseaux métaboliques sont constitués de l'ensemble des réactions métaboliques qu'un organisme peut réaliser telles que la glycolyse, la voie des pentoses phosphates, etc. Si une voie métabolique contient un grand nombre de métabolites discriminants, alors elle est très probablement affectée. Les réseaux métaboliques sont reconstruits à partir des données de séquençages du génome d'un organisme, et des données biochimiques et métaboliques disponibles dans la littérature (Thiele and Palsson 2010). Ces réseaux métaboliques sont développés pour de nombreux organismes et sont ensuite disponibles dans plusieurs bases de données. Par exemple, la plateforme MetExplore regroupe les réseaux métaboliques d'un grand nombre d'organismes tels que des bactéries, des parasites ou l'Homme (Cottret et al. 2018). Le réseau métabolique Humain RECON 2.2 possède par exemple 7785 réactions et 5324 métabolites (Swainston et al. 2016).

Comme détaillé en introduction générale, la métabolomique est une technologie récente, qui commence à être utilisée dans le domaine de la toxicologie, notamment pour étudier les effets des contaminants alimentaires. Dans la suite de ce manuscrit, la vaste famille des PFAS, qui sont des contaminants alimentaires et environnementaux sera présentée en se focalisant sur le PFOA qui est un des PFAS les plus fréquemment retrouvés dans l'environnement et la chaîne alimentaire.

1.3 Les PFAS : des contaminants persistants avec des effets fortement suspectés sur la santé humaine

Les PFAS constituent une grande famille de contaminants alimentaires ayant beaucoup focalisé l'attention des scientifiques au cours des dernières années. Ils sont fortement suspectés d'affecter la santé humaine. Bien que caractérisés chez les animaux, les réels effets des PFAS sur la santé humaine restent encore aujourd'hui moins bien connus, et ce notamment pour ce qui est de leurs effets à long terme et à de faibles doses d'exposition. Il est nécessaire de mieux caractériser les dangers associés à cette famille, pour pouvoir préciser l'évaluation de leurs effets sur la santé humaine. De nos jours, il y a une prise de conscience du public, de la présence de ces composés dans l'alimentation, et de leur potentiel danger pour la santé humaine. Cela est illustré notamment par la diffusion récente de documentaires et de films concernant ces composés. On peut citer par exemple, la sortie d'un documentaire en 2018 intitulé « The devil we know » qui dénonce les pratiques de la société Dupont aux Etats-Unis. Cette société a en effet volontairement rejeté des PFAS dans l'eau aux Etats-Unis (Shin et al. 2011a). Plus récemment, un film sorti en 2020 intitulé « Dark waters » raconte l'histoire du combat mené par un avocat qui s'est battu pour dénoncer les agissements de la société Dupont concernant les PFAS.

1.3.1 Que sont les PFAS ?

Le terme PFAS provient de l'anglais, « per- and polyfluoroalkyl substances », ce qui peut être traduit en français par « composés per- et polyfluoroalkylés ». Par le passé, cette large famille de molécules était aussi nommée PFC pour le terme « Perfluorinated Compounds ». Dans la suite de ce manuscrit, l'ensemble des composés perfluorés et polyfluorés seront désignés sous l'acronyme PFAS.

Les PFAS constituent une vaste famille de molécules caractérisées par la substitution totale ou partielle d'atomes d'hydrogènes (H) par des atomes

de fluor (F) sur les atomes de carbone (C), à l'exception du groupement fonctionnel de la molécule (Buck et al. 2011). Les termes « perfluoré » et « polyfluoré » signifient donc qu'il y a respectivement une substitution totale ou partielle de ces atomes. Il existe de nombreux rapports qui tentent d'estimer leur nombre (Buck et al. 2011; ANSES 2017). Cependant, ce chiffre ne cesse d'augmenter au fil du temps du fait de l'utilisation de nouveaux PFAS dans le monde et de développements analytiques de plus en plus performants permettant leur détection. La dernière étude de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE) datant de 2018 dénombre 4730 PFAS répertoriés à ce jour (OCDE 2018). Les molécules de cette famille se différencient entre elles par la longueur de leur chaîne carbonée et par la présence de différents groupements fonctionnels au sein de la molécule. Il existe aussi des molécules présentant des ramifications ou des cycles. La figure 5 illustre les structures chimiques de plusieurs PFAS.

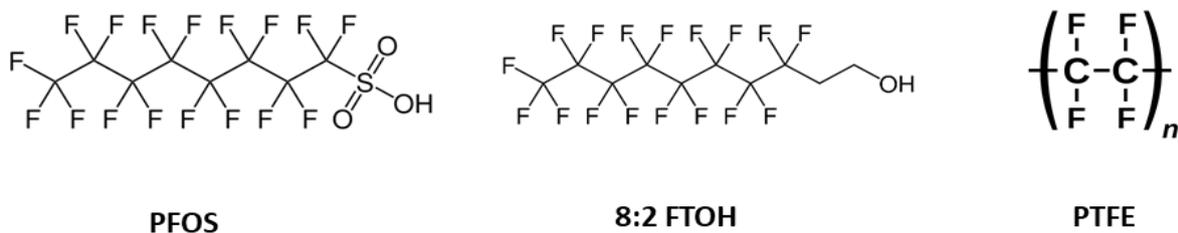


Figure 5 : Présentation de la structure chimique de l'acide perfluorooctane sulfonique (PFOS), de l'alcool fluorotélomère 8:2 (8:2 FTOH) et du Polytétrafluoroéthylène (PTFE).

Afin de distinguer les différents PFAS, une classification a été entreprise par Buck *et al.* (Buck et al. 2011) et poursuivie par l'OCDE en 2018 (OCDE 2018) (Figure 6). Trois grandes familles y sont distinguées: (1) les « perfluoroalkyl acids » (PFAA), c'est-à-dire les molécules possédant un groupe fonctionnel acide tel que le PFOS présenté dans la figure 5; (2) les précurseurs, c'est-à-dire tous les composés généralement de faible stabilité et qui peuvent se dégrader notamment en PFAA comme le 8:2 FTOH présenté dans la figure 5; (3) une troisième catégorie correspondant aux polymères de composés perfluorés, c'est-à-dire un enchaînement de motifs structuraux identiques tels que le polytétrafluoroéthylène (PTFE) présenté dans la figure 5. Ces polymères sont généralement issus de nombreuses réactions chimiques impliquant des PFAA (ANSES 2017).

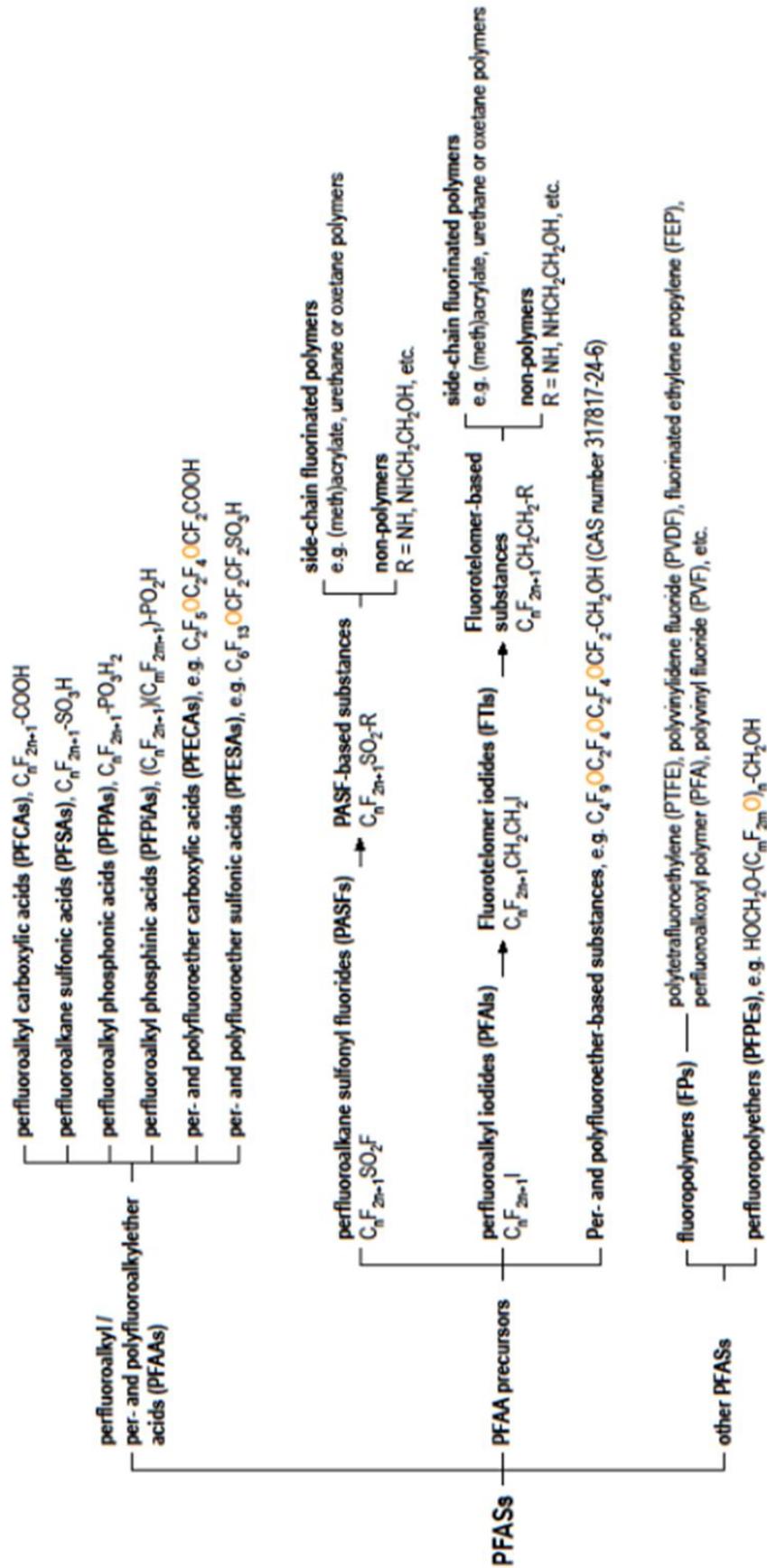


Figure 6 : Classification OCDES des PFAS (OCDE 2018)

Ainsi, les PFAS sont des substances d'origine humaine qui ne sont pas naturellement présentes dans l'environnement. Ces substances de synthèse sont fabriquées depuis les années 1950 et sont utilisées pour de nombreuses applications industrielles et produits liés à la consommation courante (ANSES 2017; Sunderland et al. 2019). La liaison d'un atome de fluor avec un atome de carbone est une liaison très stable en chimie organique (450 kJ) (Buck et al. 2012). L'atome de fluor possède aussi une forte densité électronique contribuant à la stabilité chimique des PFAS (Krafft and Riess 2015). De ce fait, les PFAS possèdent une haute résistance à la fois thermique et chimique. De plus, de par cette structure, les PFAS possèdent des propriétés physicochimiques à la fois lipophile (repoussant les lipides) et hydrophobe (repoussant l'eau). C'est pour toutes ces propriétés que les PFAS sont utilisés pour de nombreuses applications industrielles. Les raisons de leur utilisation sont diverses : ils sont employés comme imperméabilisants et agents anti-tâche dans les textile (vêtements, tapis, cuirs, chaussures), comme protection antiadhésive (poêles de cuisson, emballages alimentaires), comme émulsifiants et agents mouillants (nettoyants, shampoings, peintures, formulations de pesticides) ou en tant que surfactants dans la production de fluoropolymères, ainsi que pour d'autres usages (mousses anti-incendie, composants électroniques, plomberie, etc.) (Buck et al. 2012; OCDE 2018).

Certains PFAS sont relâchés directement dans l'environnement et contaminent les eaux, les sols et l'atmosphère depuis des décennies (Esteban 2019). La quantité de PFAS rejetée dans l'environnement a été estimée entre 3200 à 7300 tonnes pour les années 1951 à 2004 dans le monde (Prevedouros et al. 2006). En France, une étude récente au niveau d'un seul cours d'eau a estimé les rejets de plusieurs PFAS à plusieurs tonnes en 2013 (4 295 kg PFHxA, 1 487 kg 6:2 FTSA, 965 kg PFNA, 307 kg PFUnDA, 14 kg PFOA)(Bach et al. 2017). On distingue ainsi deux sources de contaminations environnementales (ANSES 2017) : une première source de contamination, directe, résultant des rejets dans l'environnement des

usines de fabrication des PFAS (PTFE ou PFAA) ou de l'utilisation de produits industriels tels que les mousses anti-incendie directement rejetés dans l'environnement. La seconde source de contamination est indirecte, provenant de la dégradation de précurseurs tels que les fluoro-télomères ou de la présence de résidus PFAS dans les produits commercialisés, qui sont évacués dans l'environnement au cours ou immédiatement après leur utilisation.

Malheureusement, de par leurs propriétés chimiques, les PFAS sont aussi très persistants dans l'environnement (Yamashita et al. 2005). Ainsi, leur large utilisation due à une demande croissante entre les années 1960 et 2000 fait qu'ils constituent un problème majeur de nos jours. Et ce d'autant plus que l'utilisation de nombreux PFAS est toujours d'actualité.

1.3.2 L'acide perfluorooctanoïque (PFOA) : une problématique mondiale

L'acide perfluorooctanoïque (PFOA), présenté sur la figure 7, possède une longueur de chaîne de 8 carbones et fait partie de la famille des PFAA par la présence d'une fonction acide carboxylique (-COOH) en bout de chaîne. Bien que beaucoup moins utilisé aujourd'hui, après l'arrêt de production des principales industries dans les années 2000 (Calafat et al. 2007b), le PFOA a été l'un des PFAS les plus utilisés dans le monde. A cause de son importante persistance, il est encore retrouvé aujourd'hui dans l'environnement. De plus, il est aussi détecté dans le plasma chez l'Homme.



PFOA

Figure 7 : Structure chimique de l'acide perfluorooctanoïque (PFOA).

Le PFOA a été utilisé pour de nombreuses applications industrielles (ANSES 2017). Des traces de ce composé ont aussi été retrouvées dans des produits de consommation courante tels qu'énoncés précédemment. On peut citer notamment la marque Téflon©, pour les poêles de cuisson dotées de revêtements antiadhésifs en PTFE, ou encore Gore-tex©, pour les tissus imperméabilisés.

a. La contamination des eaux par le PFOA au niveau mondial

La liaison covalente entre le carbone et le fluor est une liaison très forte (450 kJ/mol) en comparaison avec une liaison carbone / hydrogène (410 kJ/mol) rendant le PFOA extrêmement stable (ANSES 2017). Cette liaison n'est pas brisée par l'action d'une forte température, de bases ou d'acides et résiste aux réactions d'oxydation, à la photolyse et à la biodégradation (Giesy et al. 2010). C'est pourquoi le PFOA est très persistant dans l'environnement avec une demi-vie estimée dans l'eau supérieure à 92 ans d'après des observations de la concentration en PFOA dans les solutions aqueuses (Vierke et al. 2012). Ainsi, le PFOA est retrouvé avec des concentrations non négligeables dans les mers et les océans dans le monde. Des concentrations encore plus élevées sont observées dans certains lacs et rivières directement exposés aux rejets industriels. On le retrouve aussi dans les eaux destinées à la consommation comme l'eau provenant des systèmes publics ou l'eau du robinet, indiquant que l'Homme est directement exposé à ce contaminant. Le tableau 2 résume les différentes publications disponibles, détaillant les observations énoncées ci-dessus (publications mesurant les niveaux de PFOA dans les eaux de différents pays).

Tableau 2 : Tableau résumant une partie des études des concentrations en PFOA retrouvées dans des eaux dans différents pays.

Références	Type d'échantillon testé	Pays/zone	Concentration retrouvée en PFOA (ng/L)
(Boiteux et al. 2012)	Système d'eau public	France	4-12
(Zhang et al. 2019)	Eau de consommation	Chine	6,2
(Thompson et al. 2011)	Usine de traitement des eaux usées	Australie	16
(Sinclair et al. 2006)	Rivière	États-Unis	20-173
(Harada and Koizumi 2009)	Différentes rivières	Japon	1-3
(Zheng et al. 2020)	Rivière	Chine	32,9
(Sun et al. 2017)	Rivière	Chine	140
(Loos et al. 2008)	Rivière	Italie	60-174
(Orata et al. 2009)	Lac	Kenya	0,400-11,65
(Boulanger et al. 2004)	Lac	États-Unis	35-42
(Yamashita et al. 2005)	Océan	Pacific ouest Atlantique Baie de Tokyo	Pacific ouest : 0,136-0,142 Atlantique : 0,1-0,439 Baie de Tokyo : 1,8-192
(3M 2007)	Eaux souterraines autour d'usines de 3M	États-Unis	24 000

b. L'exposition humaine au PFOA

Comme d'autres PFAS, par sa grande persistance, le PFOA est capable de contaminer l'eau, la flore et la faune. La bioamplification d'une substance est l'augmentation de sa concentration dans les organismes au sein d'une chaîne alimentaire. Ceci se produit du fait de son absorption alimentaire plus rapide que son élimination (Gobas and Morrison 2000). Certaines études ont démontré une bioamplification du PFOA particulièrement dans les organismes marins et d'eau douce tels que les microalgues, mollusques, poissons, oiseaux et mammifères marins (Martin et al. 2004; Kelly et al. 2009; Munoz 2015). De nombreuses études ont détecté le PFOA dans des aliments, notamment dans différents produits de consommation de la vie quotidienne, et plus particulièrement dans les poissons (Kannan et al. 2005; Tittlemier et al. 2007; Ye et al. 2008). Par exemple, plusieurs études ont mesuré les taux de différents PFAS dans les poissons d'eau douce et de mer aux Etats-Unis et les concentrations en PFOA retrouvées peuvent atteindre 0.88 à 4.4 ng/g (Furdui et al. 2007; De Silva et al. 2011). Une autre étude a mesuré les niveaux de PFOA dans 31 articles alimentaires collectées dans une épicerie en 2009 aux Etats-Unis (Schechter et al. 2010). Dans cette étude, le PFOA était le PFAS le plus fréquemment détecté (dans 17 des 31 articles) avec des niveaux allant de 0,07 ng/g dans les pommes de terre à 1,80 ng/g dans l'huile d'olive. C'est pourquoi l'Homme est directement exposé à ce composé par l'alimentation et par l'eau, qui semblent être les sources principales de contamination (Emmett et al. 2006; Tittlemier et al. 2007; Trudel et al. 2008). Il existe aussi d'autres sources de contamination au PFOA, notamment via l'air (Barber et al. 2007), incluant le cas des poussières (Kubwabo et al. 2005). Trudel et ses collaborateurs ont estimé que 94% de la contamination au PFOA provient d'une contamination par l'eau, la nourriture et les poussières pour des populations faiblement exposées (Trudel et al. 2008). De plus, il a été constaté que des PFAS se dégagent des ustensiles de cuisine antiadhésifs lors de la cuisson et peuvent aussi migrer des emballages en contact avec les aliments vers les aliments

eux-mêmes (Begley et al. 2005; Sinclair et al. 2007). Cependant, l'exposition via les produits manufacturés tels que les textiles et via les emballages alimentaires représenterait une part mineure de l'exposition humaine (Trudel et al. 2008). Il a aussi été démontré que les travailleurs dans les industries chimiques utilisant le PFOA peuvent être exposés à de grandes quantités de PFOA comparé à la population en générale. Cela passe par l'ingestion de poussières fortement contaminées (Trudel et al. 2008; Steenland et al. 2009).

De nos jours, le développement de méthodes analytiques performantes à haut débit, telles que la SDM couplée à des techniques de chromatographie permettent de détecter et de quantifier un grand nombre de PFAS. Certaines méthodes sont en cours d'optimisation afin de mesurer une variété de PFAS en même temps à partir du même échantillon (Dodds et al. 2020). Le développement de ces méthodes permet d'être plus précis dans la quantification des PFAS dans de nombreuses matrices telles que l'eau, la nourriture, les échantillons sanguins, etc. Cependant, les données des industriels sur la nature des PFAS utilisés ne sont pas transmises aux analystes/chercheurs. C'est pourquoi, ces étapes de détection prennent du temps, et beaucoup de PFAS qui leurs sont encore inconnus, ne peuvent pas encore être quantifiés dans ces différentes matrices.

La présence du PFOA dans le sérum humain a été démontrée dans de nombreux pays. Par exemple, certaines études de cohorte mesurant les taux de PFOA sur plusieurs milliers d'échantillons sanguins ont détecté le PFOA dans 100 % des échantillons (Boronow et al. 2019; Salihovic et al. 2019). De plus les concentrations en PFOA retrouvées dans ces études semblent indiquer qu'il fait partie des PFAS possédant les concentrations plasmatiques les plus élevées, pouvant atteindre 10 μ M chez les populations les plus exposées. Certaines études ont étudié les variations de concentrations en PFOA en fonction du sexe et de l'âge (Frisbee et al. 2009). Ces concentrations semblent plus élevées chez les hommes (dans toutes les tranches d'âges) que chez les femmes. Concernant les différences en

fonction de l'âge, les valeurs semblent plus élevées lors de l'enfance et diminuent au cours de l'adolescence, jusqu'à environ 25 ans. Puis, ces concentrations semblent augmenter tout au long de la vie (voir figure 8). Cependant, ces articles ne concluent pas sur les raisons de ces observations en fonction de l'âge et du sexe (Frisbee et al. 2009). D'autres études ont observé que le passage transplacentaire et l'allaitement entre la mère et l'enfant sont deux voies importantes d'exposition chez l'Homme.

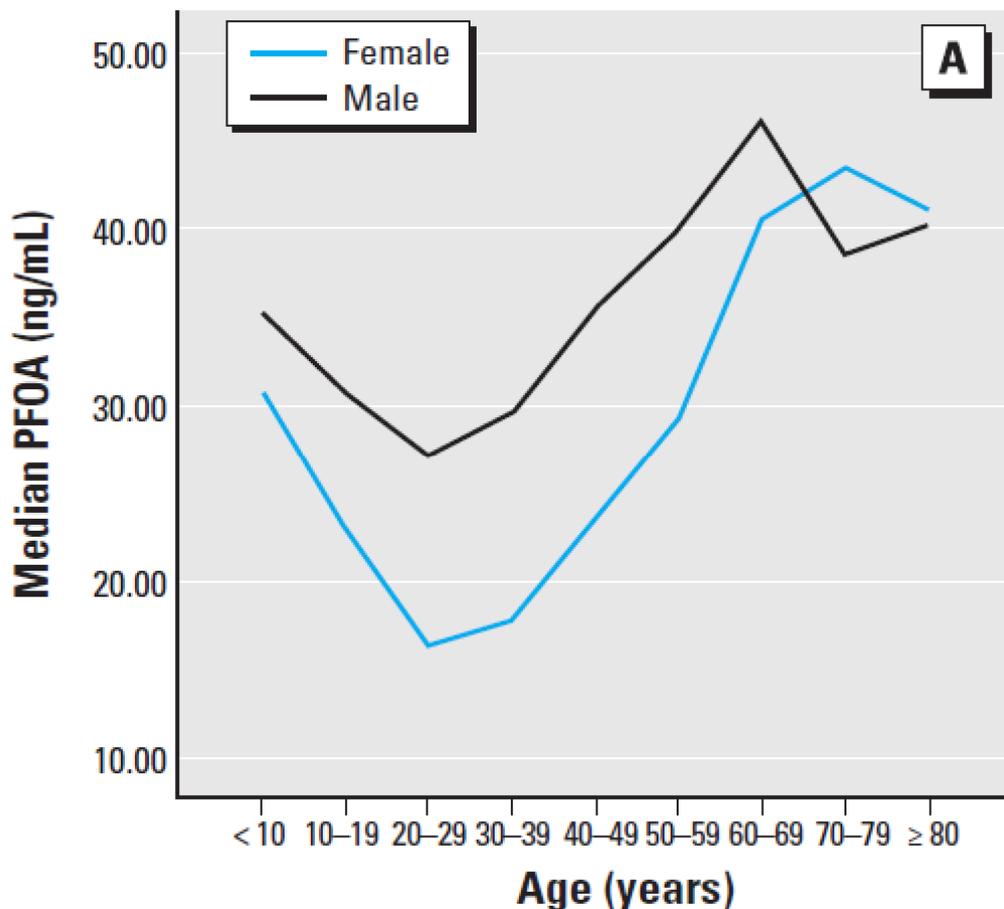


Figure 8 : Concentrations plasmatiques en PFOA chez l'Homme, classées par genre et par âge. (n=69 030), Cette figure est issue de Frisbee et collaborateurs (Frisbee et al. 2009)

Il a notamment été rapporté une concentration moyenne en PFOA de 0,919 ng/mL et de 0,041 ng/mL dans le sérum de cordon ombilical et dans le lait maternel, respectivement, en France (Cariou et al. 2015).

Beggs et ses collaborateurs (Beggs et al. 2016) ont pu en 2016, grâce aux données disponibles dans la littérature, récapituler les différentes concentrations plasmatiques en PFOA retrouvées chez 3 types de populations. Le tableau 3 résume une partie des études ayant permis un classement en 3 catégories.

- Dans la population générale, les concentrations plasmatiques en PFOA sont situées entre 10 et 100 nM (Lau 2012; Chang et al. 2014; Gleason et al. 2015).
- Pour les populations résidant autour des industries utilisant du PFOA, qui peuvent être de ce fait plus exposées que la population générale, les concentrations en PFOA sont comprises entre 12 et 1297 nM (Lau 2012; Chang et al. 2014; Gleason et al. 2015).
- Les travailleurs exposés présentent les concentrations plasmatiques les plus élevées, approchant une concentration de 10000 nM ou plus (Sakr et al. 2007; Olsen and Zobel 2007; Lau 2012; Chang et al. 2014).

Tableau 3 : Tableau résumant une partie des études concernant les concentrations plasmatiques en PFOA retrouvées chez l'Homme dans différents types de populations.

Références	Pays	Type de population	Concentration moyenne en PFOA (ng/mL)
(Cariou et al. 2015)	France	Générale	1,22
(Salihovic et al. 2019)	Suède	Générale	3,3
(Zhang et al. 2019)	Chine	Générale	1,2
(Li et al. 2019)	Suède	Générale	16
(Calafat et al. 2007a)	Etats-Unis	Générale	5,2
(Calafat et al. 2007b)	Etats-Unis	Générale	3,95
(Olsen et al. 2017)	Etats-Unis	Générale	1,09
(Shin et al. 2011b)	Etats-Unis	Résidents exposés	24,3
(Steenland et al. 2009)	Etats-Unis	Résidents exposés	148
(Emmett et al. 2006)	Etats-Unis	Résidents exposés	371
(Olsen and Zobel 2007)	Etats-Unis	Travailleurs exposés	4 630
(Costa et al. 2009)	Italie	Travailleurs exposés	5 710
(Woskie et al. 2012)	Etats-Unis	Travailleurs exposés	2 050

La société 3M, qui représentait environ 80 à 90 % de la production mondiale (ANSES 2017), a décidé d'interrompre la production du PFOA depuis la fin de l'année 2002 (Prevedouros et al. 2006). Depuis cet arrêt de production, les concentrations plasmatiques constatées dans les études humaines pour le PFOA semblent diminuer lentement au cours du temps. Les concentrations plasmatiques mesurées par des programmes de biosurveillance entre les années 2000 et 2014 sont résumées dans le tableau 4. La grande stabilité et la persistance de ce composé conduisent logiquement au fait qu'il est encore fortement détecté de nos jours dans l'eau et la nourriture, ainsi que dans le sérum humain malgré la forte réduction de son utilisation (Esteban 2019; Salihovic et al. 2019).

Tableau 4 : Concentrations plasmatiques en PFOA mesurées par des programmes de biosurveillance entre les années 2000 et 2014 (EFSA 2018).

Références	Dates	Concentration moyenne en PFOA (ng/mL)
(Calafat et al. 2007b)	1999–2000	5,20
(Calafat et al. 2007b)	2003–2004	3,95
(CDC 2018)	2005–2006	3,92
(CDC 2018)	2007–2008	4,12
(CDC 2018)	2009–2010	3,07
(CDC 2018)	2011–2012	2,08
(CDC 2018)	2013–2014	1,94

1.3.3 Législation actuelle concernant le PFOA

En Europe, le PFOA fait l'objet de nombreuses recommandations ayant évoluées au fil du temps (Cordner et al. 2019). C'est à partir du 14 juin 2013 que le PFOA, ses sels et substances apparentées, sont clairement identifiés comme substances persistantes, bioaccumulables et toxiques en Europe. A partir de cette date, des propositions visant à réduire son utilisation ont émergé. Le 13 juin 2017, l'annexe XVII du règlement du Parlement européen concernant l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances a été modifiée afin d'interdire la production de PFOA et limiter sa présence dans les produits commercialisés au sein de l'Union Européenne. Selon le texte officiel (EUR-Lex 2017), les restrictions concernant le PFOA dans ce texte de loi européenne sont assorties de nombreuses exceptions ou exclusions :

- Depuis le 4 juillet 2020, le PFOA est soumis à une interdiction de production ou de mise sur le marché européen en tant que substance chimique. Cette restriction a été différée jusqu'en 2032 pour certains produits commercialisés, tels que certains dispositifs médicaux nécessitant l'utilisation de ce composé.
- À partir du 4 juillet 2020, la concentration du PFOA en tant que constituant a été limitée à 25 ppb (partie par milliard) ce qui correspond à 0,025 mg/L ou 25 µg/kg, dans un liquide ou un article solide. Un seuil de 1000 ppb est appliqué aux substances apparentées, c'est-à-dire des substances dont la structure moléculaire est susceptible de se décomposer pour donner du PFOA.

L'application de ce texte de loi est donc très récente, cependant, les industries utilisant du PFOA utilisent maintenant d'autres composés perfluorés tels que le GenX ou l'ADONA qui ont récemment été mis en évidence dans l'environnement (Gebbinck et al. 2017). Mais comme expliqué précédemment, de par sa grande résistance thermique et mécanique, le PFOA est toujours détecté aujourd'hui dans les eaux et chez l'Homme. D'autres agences telles que l'EFSA, pour l'Europe, ont évalué les risques

relatifs au PFOA. L'EFSA a établi dans un premier temps, en 2008, une dose journalière tolérable (DJT) pour le PFOA fixée à 1500 ng/kg/jour (EFSA 2008). Cependant, cette valeur a été fortement diminuée en 2018 en établissant une Dose Hebdomadaire Tolérable (DHT) à 6 ng/kg/semaine (EFSA 2018). Ainsi la DJT précédemment établie en 2008 a été divisée d'un facteur proche de 2000. Très récemment, les dernières recommandations de l'EFSA, publiées le 17 septembre 2020, ont établi une nouvelle DHT fixée à 4,4 ng/kg de poids corporel/semaine pour une combinaison de 4 PFAS : le PFOA, le PFOS le PFNA et le PFHxS (Schrenk et al. 2020). Ainsi, pour le PFOA, de nombreuses personnes sont désormais exposées à des doses proches du seuil établi par l'EFSA.

Aux Etats Unis, le PFOA n'est plus autorisé depuis plusieurs années. En 2006, l'agence de protection environnementale aux Etats-Unis (US-EPA) a conclu un accord avec les entreprises américaines utilisant le PFOA afin d'éliminer son utilisation aux Etats-Unis avant 2015. Pour l'instant, l'EPA n'a pas établi de limite sur les niveaux acceptables de PFOA dans l'eau potable. Cependant, en 2016, l'EPA a établi une liste de recommandations à propos du PFOA et d'autres PFAS, fixant un niveau d'alerte sanitaire à 0,07 µg/L dans l'eau (EPA 2016). Mais cette valeur vise principalement à informer les organismes chargés de superviser les réseaux d'eau afin qu'ils puissent prendre les mesures appropriées pour protéger leurs résidents. De plus ces valeurs de recommandation peuvent changer aux États-Unis d'Amérique (USA) d'un état à un autre (Cordner et al. 2019).

Concernant le reste du monde, certains pays d'Asie et du Moyen Orient ne possèdent pas de restrictions concernant les utilisations industrielles du PFOA. Beaucoup de ces pays voient leur utilisation en PFOA augmenter sur les dernières années, c'est notamment le cas pour la Chine. D'autres pays comme le Bangladesh, l'Égypte, l'Inde, l'Indonésie, le Japon, la Malaisie, la Thaïlande ou le Vietnam possèdent très peu ou aucune restriction concernant ce composé. Ainsi, beaucoup de productions industrielles incluant du PFOA se poursuivent dans ces pays et les produits fabriqués

peuvent ensuite être exportés en Europe ou en Amérique, où il n'existe pas de loi sur l'importation de produits industriels qui contiennent du PFOA. C'est pourquoi les produits fabriqués sont facilement réintroduits en Europe ou aux USA par la suite (Mitchell 2020).

Dans l'ensemble des recommandations et textes de loi mentionnés dans cette partie, d'autres PFAS tels que le PFOS, le PFNA, le PFHxS, le PFHpA, le PFBS font aussi l'objet de recommandations ou de restrictions concernant les niveaux retrouvés dans les aliments ou dans l'eau. Cependant, l'ensemble des 4730 PFAS recensés à ce jour ne sont pas concernés. Par exemple, d'autres PFAS récemment mis en évidence tels que le GenX ou l'ADONA ne font pour le moment pas l'objet de recommandation ou d'interdiction. Des études de toxicologie sont en effet nécessaires sur ces nouveaux composés perfluorés pour mieux caractériser leurs effets. Récemment, une perspective d'interdiction de certains PFAS au niveau mondial a été proposée en 2019 dans le cadre de la convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants, qui a ajouté le PFOA à la liste des substances à éliminer (COP9 2019).

1.3.4 Les effets toxiques suspectés du PFOA

a. La toxicocinétique du PFOA

La toxicocinétique étudie le comportement d'une molécule dans un organisme et est un des éléments clés permettant une meilleure compréhension des effets potentiels de cette molécule *in vivo*. Elle couvre les étapes d'absorption, de distribution, de métabolisation et d'élimination (ADME) de la molécule étudiée. Plusieurs études de toxicocinétique ont été réalisées pour le PFOA, chez les rongeurs et chez l'Homme.

- Concernant l'absorption du PFOA, il a été démontré que le PFOA peut être absorbé par voie orale, respiratoire ou dermique (Lau et al. 2007; Trudel et al. 2008). Chez le rat, plus de 95 % d'une dose de [¹⁴C]-PFOA a été absorbée après exposition par voie orale à une dose

unique allant de 0,1 à 25 mg/kg chez le mâle et la femelle (Kemper and Jepson 2003). Chez les souris mâles et femelles, l'administration orale du PFOA a montré que 90 à 100 % de la dose était absorbée (Fujii et al. 2015). Comme détaillé précédemment, il est estimé chez l'Homme que la plus grande partie de l'exposition au PFOA résulte de la consommation d'aliments contaminés et d'eau potable dans la population générale. Cependant la contamination par l'exposition aux poussières semble prendre plus d'importance pour les populations exposées régulièrement au PFOA tels que certains travailleurs (Trudel et al. 2008).

- Plusieurs études ont observé la distribution du PFOA dans l'organisme. Chez le rat, le PFOA semble se distribuer majoritairement dans le foie, le sang et les reins représentant plus de 60 % de la dose absorbée. Le PFOA peut aussi être retrouvé en plus faible concentration dans d'autres organes comme les poumons ou la peau (Hundley et al. 2006). Une étude réalisée post mortem chez l'Homme mesurant les concentrations en PFOA dans les tissus montre que le PFOA est majoritairement retrouvé dans les os, le foie et les poumons à des concentrations de 60,2, 13,6 et 29,2 ng/g respectivement (Pérez et al. 2013). Il semble toutefois qu'une grande quantité de PFOA soit capable de se fixer aux protéines plasmatiques telles que l'albumine (Han et al. 2005), ce qui peut influencer la toxicité de ce composé avec des échanges possibles entre la circulation sanguine et les protéines plasmatiques au cours du temps. Il est aussi important de souligner que le PFOA peut également être transféré aux fœtus en développement, ainsi qu'aux nourrissons. En effet, plusieurs études ont détecté des concentrations non négligeables dans le sérum du cordon ombilical ainsi que dans le lait maternel (Cariou et al. 2015).
- La métabolisation concerne l'ensemble des processus biochimiques visant à transformer une molécule afin de faciliter son élimination par l'organisme. Concernant la métabolisation du PFOA, les résultats des

études *in vivo* et *in vitro* disponibles suggèrent que le PFOA ne subit pas de biotransformation dans l'organisme. Après une exposition de 4 mg/kg de ¹⁴C-PFOA chez le rat mâle et femelle pendant 28 jours, seul du PFOA inchangé a été retrouvé dans l'urine et la bile (Vanden Heuvel et al. 1991). De plus, une absence de métabolisation a également été mise en évidence après incubation avec des fractions microsomales d'intestin humain ou de rat, de rein, ou des homogénats de foie (Kemper and Nabb 2005). Ainsi, aucune étude n'a pour le moment démontré un mécanisme de métabolisation du PFOA dans l'organisme chez l'Homme ou chez l'animal.

- Chez les rongeurs, la principale voie d'élimination du PFOA est la voie urinaire, avec un fort différentiel d'élimination en fonction du sexe chez les rats. En effet, il a été démontré que les rattes éliminaient le PFOA beaucoup plus rapidement que les rats mâles. Le temps de demi-vie chez les rats a été estimé entre 44 à 322 heures chez les mâles (Benskin et al. 2009; Kim et al. 2016) et entre 1,9 à 3,6 heures chez les femelles après une exposition orale à ce composé (Kudo et al. 2002; Kim et al. 2016). Chez les souris mâles et femelles, le temps de demi-vie a été estimé entre 17 et 19 jours après une exposition orale (Chang et al. 2008). L'élimination chez l'Homme et le singe semble bien différente des observations obtenues chez les rongeurs. En effet, le PFOA paraît être éliminé beaucoup moins rapidement et semble s'accumuler dans l'organisme au cours du temps, notamment au niveau de l'albumine plasmatique (Harada et al. 2005). Ainsi le temps de demi-vie a été estimé entre 20,1 et 32,6 jours chez le macaque crabier (*Macaca fascicularis*) (Butenhoff et al. 2004), mais à 3,8 années chez l'Homme (Olsen et al. 2007). La voie principale d'élimination semble être la voie urinaire pour l'ensemble des espèces, avec une part non négligeable d'excrétion biliaire. Chez l'Homme, il a été estimé que moins de 0,1% du PFOA est excrété par

voie urinaire (EFSA 2018). Le tableau 5 résume les différentes demi-vies estimées pour plusieurs espèces.

Enfin, l'allaitement aussi bien que le transfert par le cordon ombilical semblent constituer des voies d'élimination importantes du PFOA pour les femme enceintes ou en allaitement. En effet, des études chez des femmes enceintes ont détecté une baisse significative de la concentration plasmatique en PFOA entre la 16ème semaine de gestation et l'accouchement (4,91 µg/L à 3,43 µg/L). De plus le PFOA a été détecté dans le cordon ombilical de ces patientes (2,85 µg/L). Les niveaux mesurés dans le lait maternel étaient bien plus faibles (20 à 150 fois) que ceux déterminés dans le sérum. En parallèle, ces données suggèrent donc également un transfert du PFOA au nourrisson pendant la grossesse et par l'allaitement (Lee et al. 2013; Ode et al. 2013; Kato et al. 2014; Cariou et al. 2015).

Tableau 5 : Différences des temps de demi vie ($T_{1/2}$) estimés pour plusieurs espèces animales et chez l'Homme, pour le PFOA.

Références	Espèces	Voie d'exposition	Sexe (M/F)	$T_{1/2}$ d'élimination estimé
(Benskin et al. 2009; Kim et al. 2016)	Rat	Orale	M	44-322 heures
(Kudo et al. 2002; Kim et al. 2016)	Rat	Orale	F	1,9-3,6 heures
(Chang et al. 2008)	Souris	Orale	M/F	17-19 jours
(Butenhoff et al. 2004)	Singe	Intraveineuse	M/F	20,1-32,6 jours
(Olsen et al. 2007)	Homme	Orale	M/F	3,8 ans

b. Effets connus du PFOA chez les animaux et chez l'Homme

Pour toutes les raisons énoncées précédemment, le PFOA suscite des inquiétudes croissantes concernant son impact sur la santé humaine, c'est pourquoi il a beaucoup été étudié au cours des dernières années. Plusieurs points d'impact et effets toxicologiques ont été étudiés chez les animaux et chez l'Homme, afin de mieux cerner les dangers de ce composé sur la santé. Les effets du PFOA au niveau hépatique, sur le système immunitaire, et son potentiel carcinogène ont particulièrement été examinés. La figure 9, issue du rapport de l'EFSA sur les PFAS en 2018, récapitule l'ensemble des effets étudiés du PFOA pour un total de 271 études, ainsi que les modalités d'exposition utilisées dans ces études (EFSA 2018). Une grande majorité des travaux a porté sur les effets d'une exposition aiguë au PFOA chez l'animal. Moins d'études se sont intéressées aux effets d'une exposition chronique. La toxicité du PFOA a donc à ce stade été majoritairement évaluée chez l'Homme et l'animal à court et moyen terme. Cependant, une comparaison directe de la toxicité du PFOA entre les différentes espèces est difficile en raison des différences de demi-vies d'élimination observées. Certaines études ont tenté de développer des modèles pharmacocinétiques pharmacodynamiques (PBPK) entre les animaux et l'Homme (Rodriguez et al. 2009; Loccisano et al. 2012; Worley et al. 2017). Ces modèles sont difficilement utilisables pour permettre une comparaison directe entre les doses administrées aux rongeurs et les concentrations plasmatiques retrouvées chez l'Homme.

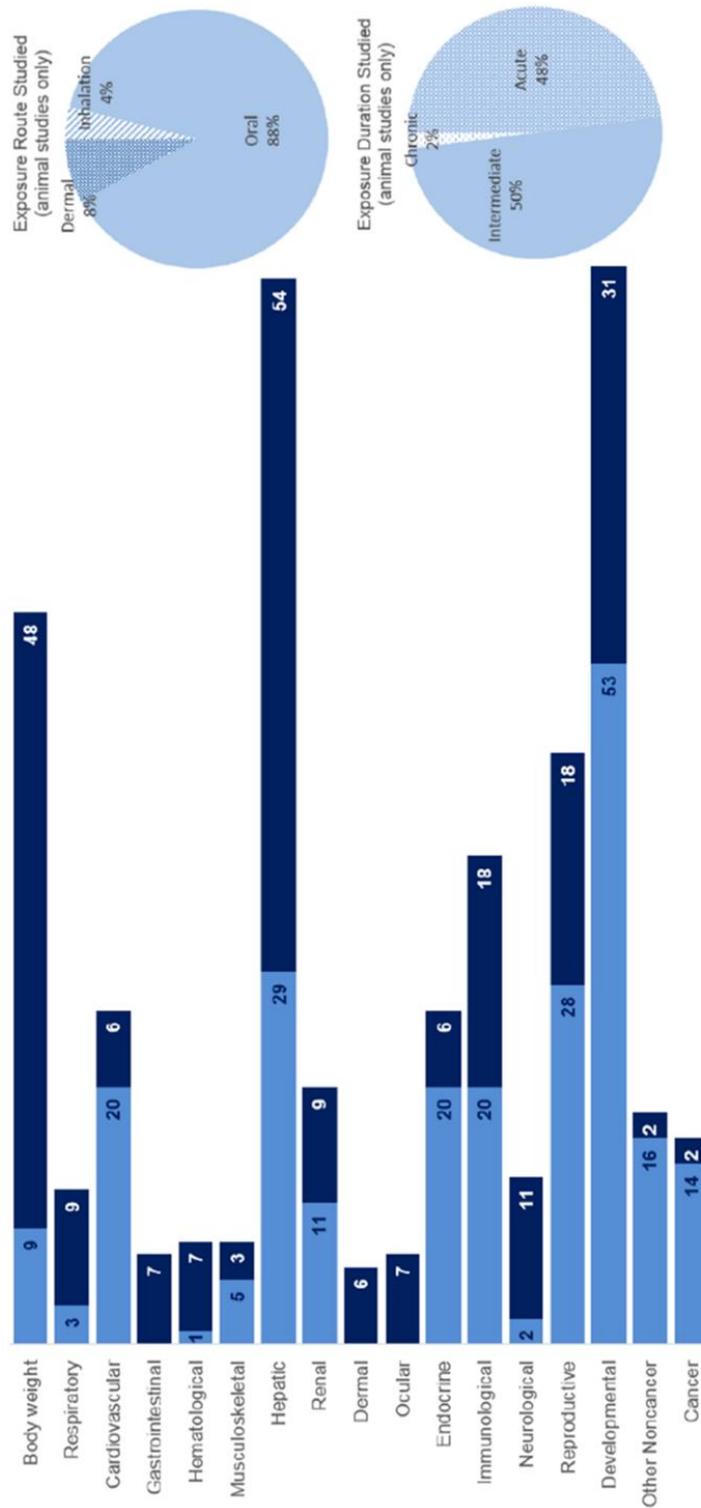


Figure 9 : schéma résumant les différents effets du PFOA étudiés chez l'homme (bleu clair) et chez les animaux (bleu foncé). Cette figure est issue du rapport de l'EFSA en 2018 (EFSA 2018), basé sur 271 articles au total. Les diagrammes indiquent les voies majoritaires d'exposition au PFOA, ainsi que les temps d'exposition au PFOA, pour les études réalisées chez l'animal.

Chez l'animal, de nombreux effets du PFOA ont été mis en évidence, particulièrement au niveau hépatique, sur le poids corporel, sur le développement et la reproduction, qui sont les principaux effets adverses rapportés dans la littérature. Des effets sur la reproduction ont également été mis en évidence, avec une altération du développement des glandes mammaires chez des souris CD-1 après une exposition à 5 mg de PFOA/kg durant les jours de gestations (White et al. 2011). Chez la souris C57BL/6, des effets sur le développement ont aussi été rapportés avec une diminution du poids corporel après exposition au PFOA sans que la concentration utilisée soit renseignée (Xie et al. 2003). De plus, une altération de l'activité locomotrice a aussi été reportée chez le rat Wistar après exposition à 10 µg/mL de PFOA (Cheng et al. 2013).

Lors de cette thèse, un intérêt particulier a été porté aux effets hépatiques et plus généralement aux effets métaboliques du PFOA. En effet, le foie semble être une cible privilégiée pour le PFOA. Au niveau hépatique, une augmentation du poids du foie, une accumulation de lipides, une hypertrophie hépatocellulaire et une altération des taux de lipides sériques et hépatique ont été démontrées. L'augmentation du poids du foie et l'hypertrophie hépatocellulaire semblent cependant être spécifiques aux rongeurs. Cette spécificité semble provenir d'une différence inter-espèce concernant le récepteur nucléaire PPAR α . L'ensemble de ces effets observés au niveau hépatique chez l'animal est récapitulé dans le tableau 6.

Tableau 6 : Principaux effets du PFOA observés au niveau hépatique chez l'animal.

Références	Modèle	Dose d'exposition en PFOA	Temps d'exposition	Effets observés
(Rebholz et al. 2016)	Souris C57BL/6 et BALB/c	0,5 mg/kg /jour	5 semaines	Hépatomégalie Augmentation du taux de cholestérol plasmatique
(Kawashima et al. 1995)	Rat Wistar	0,01 % dans la nourriture	1 semaine	Augmentation du poids du foie
(Perkins et al. 2004)	Rat Wistar	0,06 à 6,5 mg/kg/jour	4 à 13 semaines	Hypertrophie des cellules hépatiques
(Haughom and Spydevold 1992)	Rat Wistar	0,02 % dans la nourriture (22,7 g/rat/jour)	1 semaine	Augmentation du poids du foie
(Elcombe et al. 2010)	Rat Sprague-Dawley	300 mg/kg dans la nourriture	1, 7 et 28 jours	Hépatomégalie Hypertrophie hépatocellulaire Diminution cholestérol et triglycérides plasmatique
(Das et al. 2017)	Souris SV129	10 mg/kg/jour	7 jours	Accumulation de triglycérides dans le foie
(Tan et al. 2013)	Souris C57BL/6N	5 mg/kg/jour	3 semaines	Augmentation ALAT plasmatique Accumulation lipidique dans le foie Augmentation du poids du foie

Chez l'Homme, de nombreux effets du PFOA ont été mis en évidence, sur la base d'études épidémiologiques (études de cohorte). Comme chez les animaux, les effets observés concernent principalement le métabolisme hépatique, le poids corporel à la naissance, le développement et la reproduction. Les principaux effets métaboliques du PFOA chez l'Homme sont résumés dans le tableau 7. Une augmentation des enzymes plasmatiques telles que l'alanine aminotransférase (ALAT), l'aspartate aminotransférase (ASAT) et la Gamma-glutamyltranspeptidase (GGT), ainsi qu'une diminution de la bilirubine sérique a été observées aux USA et au Japon, dans la population générale. Une variation de la concentration sanguine de ces enzymes témoigne généralement d'une cytolysse hépatique. De plus, une augmentation des taux de lipides plasmatiques, en particulier du cholestérol total et du cholestérol LDL, a aussi été rapportée.

L'ensemble de ces effets chez l'Homme au niveau plasmatique fait partie des études clés ayant conduit l'EFSA à revoir la recommandation de la Dose Journalière Tolérable (DJT) établie en 2008 pour le PFOA à 1500 ng/kg/jour (EFSA 2008). Cette valeur a été fortement diminuée en 2018 en établissant une Dose Hebdomadaire Tolérable (DHT) à 6 ng/kg/semaine (EFSA 2018).

Tableau 7 : Principaux effets métaboliques du PFOA observés chez l'Homme.

Références	Concentration médiane/moyenne en PFOA (ng/mL)	Type de population	Effets observés au niveau plasmatique
(Fitz-Simon et al. 2013)	74,8	Résidents exposés (H/F) USA 560 adultes de 20 à 60 ans	Augmentation LDL cholestérol et du cholestérol total
(Gleason et al. 2015)	3,5	Population générale (H/F) USA N= 30 723 (12 à 80 ans)	Augmentation ALAT, ASAT, GGT
(Timmerman et al. 2014)	16,9	499 Enfants en surpoids (8 à 10 ans)	Augmentation triglycérides
(Sakr et al. 2007)	428	Travailleurs exposés (H/F) 1025 Adultes de 44 ans en moyenne	Augmentation des LDL, VLDL GGT
(Yamaguchi et al. 2013)	2,1	Population générale (H/F) Japon N=808 16 à 76 ans	Augmentation ALAT, ASAT, GGT
(Costa et al. 2009)	4443 à 5710	Travailleurs exposés (H) USA N=53 20 à 63 ans	Augmentation LDL et total cholestérol

D'autres études ont tenté de cerner plus précisément les effets du PFOA sur l'organisme, et plus particulièrement sur le foie. Pour cela, des modèles *in vitro* et *in vivo* ont été utilisés afin de tenter de comprendre les mécanismes d'actions du PFOA sur le foie. Il existe de nombreuses études suggérant que certains effets hépatiques observés chez les rongeurs impliquent l'activation du récepteur nucléaire activé par les proliférateurs de peroxyosomes alpha (PPAR α) (Bjork and Wallace 2009; Bjork et al. 2011). PPAR α régule l'homéostasie des lipides en modulant l'expression des gènes impliqués dans l'absorption, l'activation et l'oxydation des acides gras (Corton et al. 2014). Cependant, l'Homme semble moins sensible aux agonistes de PPAR α que les rongeurs, ce qui rend les comparaisons inter-espèces complexes (Vanden Heuvel et al. 2006; Takacs and Abbott 2007; Corton et al. 2014). D'autres études montrent que le récepteur PPAR α ne serait pas le seul récepteur impliqué dans la réponse toxique. Le PFOA serait aussi capable d'affecter le récepteur nucléaire PPAR γ qui est un récepteur de la même famille que PPAR α , ainsi que le récepteur constitutif des androstanes (CAR), qui joue un rôle important dans le processus de détoxification du foie (Rosen et al. 2008, 2017). D'autres études ont montré la capacité du PFOA à se fixer sur le récepteur des estrogènes (ER α) (Qiu et al. 2020). Ainsi, le PFOA peut passer par d'autres voies que les récepteurs PPAR, ce qui aux vu des données disponibles dans la littérature amplifie les suspicions que ce composé pourrait être un perturbateur métabolique. Pour le PFOA, une dérégulation du métabolisme, notamment au niveau hépatique est fortement suspectée chez l'Homme. La mise en évidence de ce type d'effets est complexe. L'utilisation d'approches technologiques omiques comme la transcriptomique, la protéomique, la métabolomique, pourrait être plus adaptée pour la mise en évidence des effets des perturbateurs endocriniens (Cabaton et al. 2013; Wadia et al. 2013) et des perturbateurs métaboliques. En effet, ces technologies récentes permettent de caractériser et de mieux comprendre le fonctionnement d'un système biologique de manière globale. Ces

technologies ont vu leurs utilisations s'accroître dans ce domaine avec le développement des techniques analytiques de plus en plus performantes avec le temps.

Plusieurs études de transcriptomique ont été réalisées sur le PFOA au niveau hépatique : ces études mettent en évidence l'activation du récepteur PPAR α (Rosen et al. 2017) ainsi qu'une augmentation de l'expression des gènes du transport des acides aminés et une diminution des gènes impliqués dans la glycolyse et la néoglucogenèse (Louisse et al. 2020). Des études de protéomique, réalisées sur un modèle cellulaire hépatique humain, ont mis en évidence des altérations enzymatiques induites par le PFOA, notamment une diminution de la production du CYP7A1 (Behr et al. 2020). Très peu d'études utilisant la métabolomique pour caractériser les effets du PFOA au niveau hépatique sont disponibles dans la littérature. L'utilisation de la métabolomique pour étudier de manière globale les effets métaboliques (directs ou indirects) d'un composé tel que le PFOA, pouvant agir sur de multiples cibles (gènes, enzymes, ...) apparaît pertinente. L'ensemble des études disponibles sur des modèles hépatiques est résumé dans le tableau 8. D'après ces études, le PFOA semble majoritairement affecter le métabolisme lipidique. Elles suggèrent aussi des altérations des acides aminés et du métabolisme énergétique. Cependant, pour les différents effets du PFOA observés chez l'animal et chez l'Homme, une majorité des études a été réalisée avec une exposition à de fortes concentrations en PFOA, limitant ainsi l'interprétation des résultats par rapport aux niveaux d'exposition humains.

Tableau 8 : Résumé des études métabolomiques réalisées au niveau hépatique sur le PFOA in vitro et in vivo.

Références	Modèle	Concentration PFOA	Temps d'exposition	Effets observés
(Tan et al. 2013)	<i>In vivo</i> Souris (foie)	5 mg/kg/jour	3 semaines	Accumulation de lipides au niveau hépatique Perturbation des voies métaboliques du glucose
(Peng et al. 2013)	<i>In vitro</i> Lignée hépatique humaine (L-02)	120 µM	72 heures	Perturbation des voies liées au métabolisme des lipides, des acides aminés, du cycle de Krebs et des acides nucléiques
(Yu et al. 2016)	<i>In vivo</i> Souris (foie)	0,5-2,5mg PFOA/kg/jour	28 jours	Les voies métaboliques impliquant les acides aminés, les lipides, les glucides et le métabolisme énergétique sont altérées
(Zheng et al. 2017)	<i>In vivo</i> Souris (foie)	1,25 mg/kg/jour	28 jours	Diminution du glucose hépatiques
(Louisse et al. 2020)	<i>In vitro</i> Lignée hépatique humaine (HepaRG)	200 µM	24 heures	Augmentation des taux de triglycérides
(Behr et al. 2020)	<i>In vitro</i> Lignées hépatiques humaines (HepaRG et HepG2)	> 20 µM	48 heures	Diminution de la synthèse d'acides biliaires
(Franco et al. 2020)	<i>In vitro</i> Lignée hépatique humaine (HepaRG)	100pM-100µM	72 heures	Accumulation de lipides au niveau hépatique
(Jin et al. 2020)	<i>In vivo</i> Plasma d'enfants atteint de stéatose hépatique non alcoolique	Concentrations plasmatiques comparable à la Population générale	7 à 19 ans	Altération des voies métaboliques liées aux acides aminés et aux lipides

1.4 Problématique et objectifs du travail de thèse

De nos jours, malgré une diminution globale de son utilisation sur le plan mondial, le PFOA représente un problème majeur de santé publique par sa grande persistance dans l'environnement, par son accumulation et ses effets supposés chez l'Homme. Comme détaillé précédemment, de nombreuses études ont déjà été réalisées concernant le PFOA, notamment en étudiant les effets de ce composé au niveau hépatique. Cependant, beaucoup d'entre elles ont été réalisées chez l'animal, pour lequel les effets biologiques sont potentiellement différents de l'Homme. De plus, une majorité de ces études a utilisé de fortes concentrations de PFOA pour en étudier les effets, s'éloignant ainsi potentiellement des doses d'exposition réalistes, compte tenu des concentrations plasmatiques établies chez l'Homme. Il apparaît donc essentiel de mieux cerner les réels risques de ce composé pour la santé humaine, en cherchant à déterminer les effets de différentes concentrations reflétant autant que possible les niveaux d'exposition chez l'Homme, dont les faibles doses d'exposition (Beggs et al. 2016). Bien entendu, l'expérimentation directe est impossible dans l'espèce humaine. Mais les approches *in vitro* sur des modèles hépatiques métaboliquement compétents, combinées avec les ressources de la métabolomique, permettent d'envisager l'identification de métabolites biomarqueurs d'effet, dont la pertinence pourra ultérieurement être évaluée *in vivo*, en prenant appui sur les études disponibles concernant des biomarqueurs plasmatiques. Plusieurs études ont mis en évidence des altérations des voies lipidiques ainsi que des altérations du métabolisme des acides aminés et des voies énergétiques hépatiques chez l'Homme et chez les rongeurs (Yu et al. 2016; Franco et al. 2020; Louisse et al. 2020), suggérant que le PFOA est un perturbateur métabolique, avec des effets ciblant vraisemblablement plusieurs voies métaboliques. **La métabolomique, qui permet d'étudier des modulations métaboliques de manière globale, apparaît donc être une**

technologie particulièrement adaptée pour l'étude des effets associés à ce composé.

L'objectif principal de ce projet de thèse est d'explorer l'ensemble des voies métaboliques hépatiques altérées lors d'une exposition à différentes concentrations de PFOA, et selon plusieurs modalités d'exposition, les plus représentatives possibles de scénarios d'exposition ponctuelle et chronique. Pour cela, nous avons fait le choix d'utiliser le modèle cellulaire hépatique humain HepaRG afin de mieux caractériser les effets de ce composé chez l'Homme et plus particulièrement au niveau du foie, qui semble être une cible importante pour le PFOA.

Tout d'abord, des approches classiques de toxicologie ont été mises en place afin de caractériser le seuil de cytotoxicité du PFOA sur notre modèle d'étude. Ensuite, le métabolisme du PFOA ainsi que sa pénétration dans les cellules HepaRG ont été étudiés grâce à l'utilisation de PFOA radiomarqué. L'objectif était de savoir si les effets pouvant être observés en métabolomique pourraient provenir uniquement du PFOA, ou d'un éventuel métabolite issu de sa biotransformation. Il a été démontré chez l'Homme que le PFOA affecte les niveaux circulants de certaines enzymes qui constituent des marqueurs plasmatiques d'une toxicité tissulaire, notamment hépatique. Un dosage de ces marqueurs dans le milieu extracellulaire des cellules HepaRG a été réalisé afin de nous permettre d'estimer à quels temps d'exposition et quelles concentrations ce type de toxicité tissulaire peut apparaître.

Pour répondre à l'objectif de cette thèse, nous avons choisi d'une part, d'étudier par métabolomique ciblée, la modulation de métabolites spécifiques impliqués dans les principales voies suspectées d'être affectées par le PFOA (acides aminés, métabolites énergétiques et certaines classes de lipides), et d'autre part d'utiliser des techniques de métabolomique non ciblée afin de rechercher la modulation d'autres classes de composés

potentiellement affectés par ce contaminant alimentaire et environnemental. Pour atteindre cet objectif, **des développements méthodologiques ont été nécessaires afin d'adapter les protocoles de culture cellulaire et de métabolomique dans le cadre spécifique de la mise en évidence des effets biologiques de ce type de modulateur métabolique.** L'étude des modulations métaboliques induites par les contaminants alimentaires qui sont des perturbateurs métaboliques et/ou endocriniens doit être évaluée y compris pour de faibles, voire de très faibles concentrations, de façon à englober autant que faire se peut, les scénarios correspondant à des doses d'exposition réelles chez l'Homme. Les effets engendrés peuvent être subtils, et ne pas être révélés par des marqueurs classiques, alors que les approches de métabolomique sont très prometteuses pour mettre en évidence ce type de perturbation. Toutefois, pour y parvenir, il est nécessaire de pouvoir éviter les écueils classiques relatifs à ce type d'approche. Comme détaillé dans la partie 1.2.3, il existe de nombreux points clés dans l'ensemble du processus de l'analyse métabolomique qui sont susceptibles d'augmenter la variabilité dans les échantillons générés. Cette variabilité est particulièrement problématique lors d'une application en toxicologie où les effets de faibles concentrations peuvent facilement être masqués. Nous avons clairement identifié l'étape de préparation des échantillons, et particulièrement l'étape d'échantillonnage, comme une étape critique dans la génération de variabilité. C'est pourquoi, nous avons fait le choix de centrer une partie des recherches de ce travail de thèse pour étudier l'impact de certains points clés des étapes de préparation des échantillons en évaluant leurs conséquences sur les résultats de métabolomique. Puis, nous les avons adaptées avec l'objectif d'optimiser la qualité des résultats produits. Nous avons notamment mis en place un protocole spécifique visant à optimiser l'étape d'arrêt du métabolisme cellulaire, en la rendant la plus rapide possible et reproductible possible. Des améliorations dans l'étape de lavage des cellules ont également été recherchées. Ces protocoles ont été

comparés avec ceux plus classiquement utilisés, pour pouvoir évaluer les bénéfices apportés, en particulier concernant la minimisation de la variabilité inter-échantillon.

Le passage cellulaire est aussi largement susceptible d'affecter le métabolome des cellules. Dans de nombreuses études, les résultats sont obtenus sur des cellules ayant un nombre de passages cellulaires différent. Or, cette différence de passage cellulaire peut générer de la variabilité entre les répliques et masquer la variation de concentrations de certains métabolites. L'impact de ce facteur a encore été très peu étudié en métabolomique (Hayton et al. 2017), mais il a été montré une modification progressive de l'expression des gènes et de l'expression de certaines enzymes en fonction du passage cellulaire (Briske-Anderson et al. 1997; O'Driscoll et al. 2006; Yu et al. 2016).

Enfin, le PFOA étant un contaminant alimentaire suspecté d'affecter de nombreuses voies métaboliques, il est aussi apparu important d'améliorer la couverture du métabolome, afin de maximiser notre capacité à observer les modulations induites par la substance étudiée. Le choix a donc été de favoriser la mesure d'un maximum de composés en même temps, sur le même échantillon. C'est pourquoi dans un troisième temps, un protocole de double extraction des métabolites polaires et des lipides a été développé avec nos collaborateurs des plateformes analytiques de Toulouse, dans le but de permettre la couverture d'un grand nombre de familles (au sens chimique) de métabolites.

2. Approches et choix méthodologiques pour le projet

L'objectif de cette partie est de présenter et justifier les différentes approches de culture cellulaire et d'analyses métabolomiques sélectionnées pour cette thèse.

2.1 Le modèle cellulaire HepaRG

Les cellules HepaRG sont une lignée cellulaire hépatique humaine. Ces cellules ont été isolées à partir d'une tumeur du foie d'une patiente souffrant d'un cancer à la suite d'une infection au virus de l'hépatite C. Cette lignée cellulaire a été cultivée pour la première fois par deux scientifiques français de l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM) en 2002. Le nom HepaRG possède ainsi les lettres initiales de ces deux chercheurs, S. Rumin et P. Gripon, « Hepa » provient de l'abréviation d'hépatique qui fait référence au foie.

Les cellules HepaRG présentent de nombreux avantages pour rechercher et étudier un effet toxique au niveau hépatique :

- C'est une lignée cellulaire, c'est-à-dire que ces cellules peuvent être conservées et être maintenues en culture sur une longue période pour un même passage, tout en conservant leurs propriétés, contrairement aux hépatocytes humains, qui ont une durée de vie limitée (quelques jours). Ainsi, contrairement à la majorité des modèles *in vitro*, il est possible de réaliser des expositions à long terme, allant jusqu'à 28 jours d'exposition, ce qui est particulièrement pertinent lors d'une étude de toxicologie visant à rechercher les effets d'un composé sur le long terme et/ou en conditions d'exposition chronique.
- La lignée cellulaire HepaRG conserve également de nombreuses qualités propres aux hépatocytes humains. Elle possède notamment de nombreuses similarités dans l'expression des gènes hépatiques (Hart et al. 2010). Ainsi, les cellules HepaRG expriment les principales fonctions du foie, dont la majorité des enzymes de biotransformation de phase I (notamment les cytochromes P450 (CYP1A2, 2C9, 2D6,

2E1, 3A4) et de phase II (UGT1A1, GSTA1, GSTA4, GSTM1...), impliquées dans les processus de détoxification, mais aussi d'anabolisme et de catabolisme endogène (Hart et al. 2010). Les cellules HepaRG expriment aussi de nombreux récepteurs nucléaires, dont certains sont fortement impliqués dans la régulation des niveaux d'expression de ces enzymes, comme les récepteurs CAR (Constitutive Androstan receptor), PXR (pregnane X receptor) (Aninat et al. 2006), ainsi que les récepteurs PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor), dont certains (PPAR α) sont des cibles suspectées des composés perfluorés.

- Les cellules HepaRG permettent d'obtenir une meilleure reproductibilité qu'avec des hépatocytes humains. En effet, les hépatocytes humains peuvent provenir d'individus très différents, par exemple un homme ou une femme, des individus fumeurs ou non-fumeurs, d'origine ethnique différente, etc. Les cellules générées par modèle HepaRG proviennent d'une seule et même personne ce qui permet de limiter ce genre de variations, qui peut induire une forte variabilité. De plus, cette lignée cellulaire est d'origine humaine ce qui facilite l'interprétation des données lorsque l'on cherche à étudier les effets chez l'Homme.
- Comme tous les modèles *in vitro*, la lignée cellulaire HepaRG est compatible avec les règles éthiques visant à limiter l'utilisation de modèles animaux dans le domaine scientifique (la règle des 3R).
- La lignée cellulaire HepaRG est de plus en plus utilisée. Depuis 2002, plus de 700 publications ont intégré l'utilisation des cellules HepaRG, principalement dans les domaines de l'hépatotoxicologie, de la biotransformation des médicaments et de l'exploration des fonctions hépatiques.

Les cellules HepaRG sont donc un modèle très pertinent pour étudier les effets d'un composé d'intérêt au niveau du foie chez l'Homme. Cependant

cette lignée cellulaire présente tout de même quelques inconvénients. Le modèle HepaRG se cultive dans un milieu de culture qui est très riche dans sa composition et qui est aussi relativement coûteux. Le temps de culture pour obtenir des cellules prêtes à l'emploi est de 1 mois après la décongélation, ce qui est très long et implique l'utilisation d'importantes quantités de milieu de culture sur cette période (Gripon et al. 2002). La lignée cellulaire HepaRG est issue d'un tissu cancéreux. Ceci permet de la conserver sur le long terme. Cependant, cela implique aussi, comme pour toute lignée cellulaire, que la lignée s'éloigne de l'état physiologique d'un hépatocyte primaire humain malgré la conservation de nombreuses activités.

Aujourd'hui, les cellules HepaRG sont commercialisées par « Biopredic international » qui est une société privée française de biotechnologie. Les cellules HepaRG doivent être différenciées en hépatocytes et en cholangiocytes qui sont des cellules épithéliales biliaires. Il existe chez Biopredic international la possibilité d'acheter les cellules HepaRG non différenciées (HPR101) ou préalablement différenciées (HPR116) sous licence d'utilisation. Les cellules HepaRG sont de plus en plus utilisées dans le monde en tant que modèle hépatique. Cette lignée cellulaire est notamment recommandée par l'OCDE pour mener des études toxicologiques au niveau hépatique. Elle est par exemple utilisée dans le projet européen de recherche Horizon 2020 « Goliath » (Legler et al. 2020) et le programme de screening américain Tox21 (Merrick et al. 2015) visant à déterminer la toxicité de nombreux composés d'intérêt.

Dans le cadre de cette thèse, les cellules HepaRG ont été sélectionnées comme modèle d'étude, pour l'ensemble des avantages évoqués précédemment. Elles provenaient de lots de cellules initialement donnés par le Dr. C. Guguen-Guillouzo. Les cellules ont été cultivées selon le protocole standard initialement décrit par Gripon et ses collaborateurs (Gripon et al. 2002). Le détail de la culture de ses cellules est représenté sur la figure 10. En résumé, les cellules HepaRG sont cultivées en

atmosphère humidifiée à 5 % de CO₂ et à 37 °C en deux étapes de 14 jours chacune : une étape de prolifération et une étape de différenciation qui permet d'obtenir deux types cellulaires : des hépatocytes qui sont de petites cellules rassemblées entre elles et des cholangiocytes qui sont des cellules épithéliales biliaires de plus grande taille que les hépatocytes, comme on peut le voir sur la photo présentée en figure 10. Le milieu de culture William's Eagle est utilisé pour la culture de ces cellules. Il est complété avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) v/v, 100 unités/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine, 5 µg/mL d'insuline, 200 mM de glutamine et 5×10^{-5} M d'hémisuccinate d'hydrocortisone. Pour la phase de différenciation cellulaire, 2% de DMSO est ajouté à ce même milieu de culture pour stimuler la différenciation.

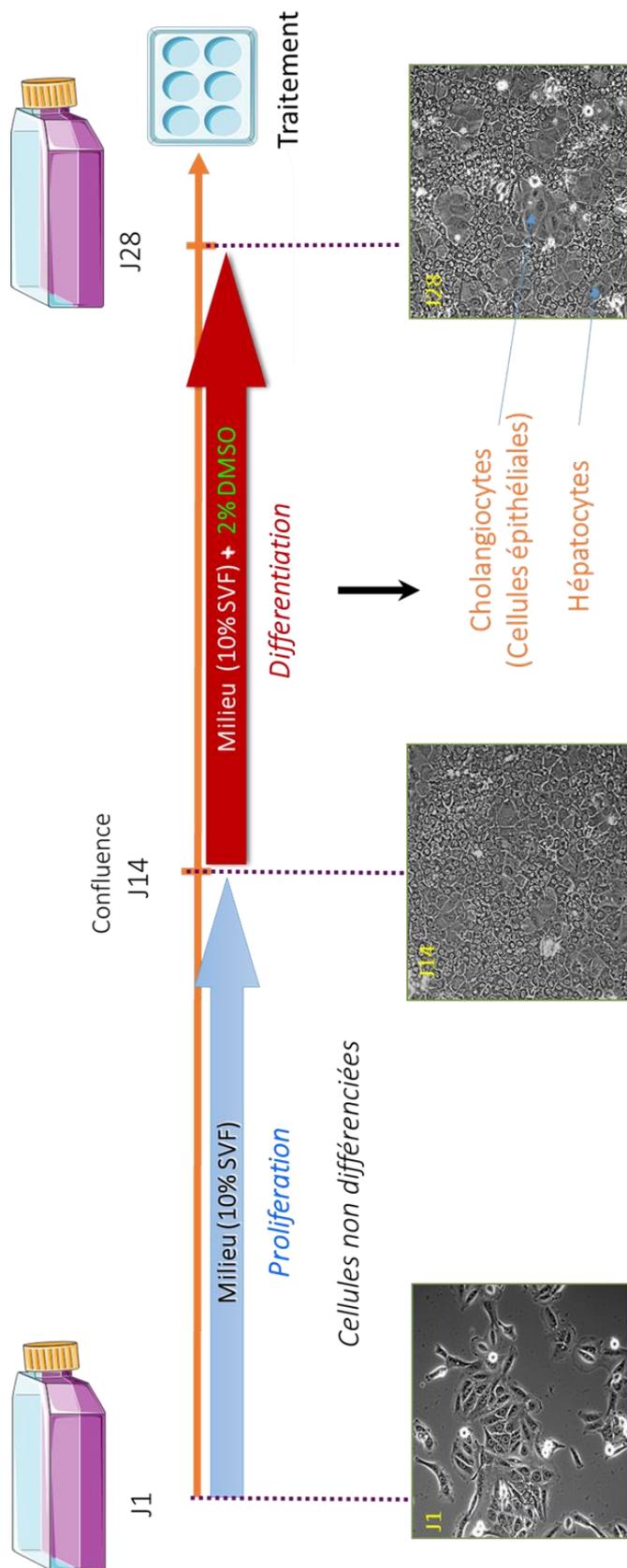


Figure 10 : Cycle de culture des cellules HepaRG selon le protocole initial décrit par (Gripon et al. 2002).

Dans ce travail de thèse, les expositions ont été réalisées sur des cellules différenciées. De plus, l'ensemble des deux types cellulaires issus de la différenciation (hépatocytes et cholangiocytes) a été récupéré et exposé sans distinction. Les cellules différenciées sont tout d'abord décollées de la flasque par l'action de la trypsine (enzyme qui va digérer les points d'ancrage des cellules sur le support). Le nombre de cellules viables obtenues est alors calculé par l'utilisation du bleu Trypan permettant de distinguer les cellules viables et non viables, puis une quantité précise de cellules ensuite être déposée dans les puits d'une plaque de traitement dans 4 mL de milieu de traitement. Une incubation de 72h permet aux cellules de se déposer au fond de chaque puits. Le milieu est ensuite retiré puis 2 mL d'un milieu de traitement spécifique sont ensuite introduits. Ce milieu de culture de base a une composition semblable aux milieux précédemment utilisés, mais il n'est supplémenté que par 5 % de SVF et ne contient pas d'indicateur coloré (rouge de phénol) pouvant gêner l'analyse des échantillons en métabolomique. Le SVF contient une forte concentration en protéines plasmatiques telles que l'albumine. Ces protéines sont capables de capter le PFOA et de fortement limiter sa biodisponibilité (Forsthuber et al. 2020). Le SVF reste tout de même indispensable pour les cellules de par l'apport de nombreux facteurs de croissance qui leurs sont essentiels (Fang et al. 2017), particulièrement lors d'exposition à long terme. C'est pourquoi, nous avons fait le choix de réduire la concentration de SVF pour limiter la fixation du composé d'intérêt sur ces protéines plasmatiques, tout en permettant la survie des cellules sur le long terme. De plus, 0,25% de diméthyl sulfoxyde (DMSO) a été utilisé, pour pouvoir ajouter le composé d'intérêt de l'expérience à une concentration connue, et dans des conditions de solubilisation suffisantes.

2.2 Les approches métabolomiques adoptées pour l'étude des effets du PFOA *in vitro*

Lors de ce travail, des analyses métabolomiques ciblées et non ciblées ont été réalisées pour étudier les effets du PFOA sur le modèle HepaRG. De plus, nous avons fait le choix de combiner ces deux stratégies sur la même séquence analytique, afin d'avoir une exploration la plus exhaustive possible du métabolome.

2.2.1 Les approches de métabolomique ciblée utilisées

Au cours de cette thèse, différentes approches de métabolomique ciblée en spectrométrie de masse ont été utilisées. Ces analyses ont été réalisées sur les plateformes de métabolomique Métatoul de Toulouse, au Toulouse Biotechnology Institute (TBI, UMR5504, UMR792) pour les analyses ciblées sur les métabolites polaires, et à la plateforme de lipidomique Métatoul de de l'INSERM Toulouse (UMR1048) pour les analyses ciblées sur les lipides.

Comme détaillé précédemment pour la spectrométrie de masse, les analyses ciblées permettent la quantification relative d'un métabolite. Une quantification absolue est aussi possible pour certaines classes de métabolites, en ajoutant une gamme de standards externes. Pour une quantification plus précise, des molécules marquées (par exemple avec du ^{13}C) sont utilisées pour corriger certaines erreurs et variations analytiques pouvant survenir lors de l'analyse.

Lors de cette thèse, des analyses ciblées quantitatives ont été réalisées pour une sélection de métabolites polaires : 19 acides aminés et 32 métabolites issus ou participant au métabolisme énergétique. L'ensemble des métabolites polaires mesurés et les méthodes analytiques utilisées pour ces analyses sont détaillés en annexe 1. Le terme « métabolites énergétiques » est un terme large utilisé dans ce manuscrit pour désigner les métabolites impliqués dans plusieurs voies du métabolisme énergétique central d'une cellule, telles que la glycolyse, le cycle de Krebs, la voie des pentoses phosphates, la voie de biosynthèse des

nucléotides, etc. Pour une mesure précise de la concentration de ces métabolites « énergétiques » et des acides aminés, des standards ^{13}C de chaque métabolite mesuré ont été introduits dans l'échantillon et dans les gammes externes afin d'obtenir un ratio d'aires entre la molécule ciblée et son standard marqué. Ce ratio d'aires permet de corriger les problèmes de variabilité pouvant être générés au cours d'une expérience, tels que des variations dans la préparation des échantillons ainsi que les variations d'intensité du signal au cours du temps. Cette méthode est appelée IDMS pour « Isotope dilution mass spectrometry ». Les standards IDMS utilisés par cette méthode peuvent être produits par un laboratoire en interne, à l'aide de bactéries ou de levures cultivées uniquement grâce à des nutriments entièrement marqués aux ^{13}C (Wu et al. 2005). Les métabolites produits par ces organismes seront alors entièrement marqués au ^{13}C .

Une quantification relative (abondance relative) a été réalisée pour les lipides, avec une mesure des phospholipides et des lipides neutres. Ces abondances relatives ont été obtenues par le rapport d'aire entre le métabolite ciblé et son standard. Lors de cette thèse, les méthodes analytiques développées par la plateforme lipidomique de MetaToul nous ont permis de mesurer 10 espèces de céramides (CER), 11 sphingomyélines (SM), 18 phosphoéthanolamines (PE), 21 phosphocholines (PC), 17 phosphatidylinositols (PI). L'analyse des lipides neutres nous a permis d'obtenir une quantification relative du cholestérol et de 6 triglycérides. L'ensemble des lipides mesurés et les méthodes analytiques utilisées pour ces analyses sont détaillés en annexe 1. Des analyses quantitatives n'ont pas pu être réalisées sur les lipides, car cela nécessiterait d'utiliser le standard correspondant pour chaque espèce spécifique mesurée, ce qui est très coûteux. Cependant, un standard interne a été utilisé spécifiquement pour chaque classe de lipide mesurée, afin d'obtenir un ratio d'aires (abondances relatives) entre chacun des métabolites mesurés pour cette classe et ce standard. Comme pour les métabolites polaires, ces standards permettent d'obtenir des abondances relatives pour corriger les problèmes

de variabilité pouvant être générés au cours d'une expérience. Ces standards sont des molécules dont la structure est proche de celles des molécules mesurées, mais qui ne sont pas présents naturellement dans les cellules. Ainsi, un mélange de CER d18:1/15:0, PE 12:0/12:0, PC 13:0/13:0, SM d18:1/12:0, PI 15:0/18:1-d7, PS 12:0/12:0, stigmastérol et triglycéride-19 a été utilisé comme standard interne pour la mesure de leurs classes de lipides respectives. La méthode utilisée pour la mesure de ces lipides nécessite une étape de séparation des lipides des autres métabolites présents, qui a été réalisée par une extraction liquide/liquide. La phase aqueuse obtenue est ainsi constituée de solvant polaire (tel que l'eau) et la phase organique est composée de solvant apolaire (tel que le dichlorométhane). Cette méthode séparative sera détaillée par la suite dans la partie 3.3.2.

2.2.2 Les approches métabolomiques non ciblées

En spectrométrie de masse, les analyses métabolomiques non ciblées ont pour objectif de détecter l'ensemble des métabolites présents dans le modèle étudié, sans *a priori*. Cela passe par une étape d'intégration de tous les pics mesurables dans les échantillons. Pour cette thèse, les analyses ont été réalisées sur les plateformes de métabolomique Métatoul de Toulouse, au TBI et sur la plateforme Axiom à l'Institut National de la Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE) de Toulouse. Les analyses métabolomiques non ciblées peuvent être divisées en deux grandes étapes : une étape de génération des données brutes et une étape de filtration des données. L'étape de génération des données brutes a été réalisée sur le site [workflow4metabolomics \(W4M\)](https://workflow4metabolomics.org/) (<https://workflow4metabolomics.org/>) (Giacomoni et al. 2015), avec le package R XCMS permettant de détecter l'ensemble des pics d'un chromatogramme, d'éliminer le bruit de fond et d'aligner les pics détectés entre les chromatogrammes obtenus.

L'objectif de cette étape est de générer un tableau permettant d'associer chaque variable détectée à un temps de rétention et une masse. Il existe de nombreux paramètres XCMS réglables en fonction de l'analyse réalisée pour les échantillons. Lors de cette thèse, un workflow automatisant l'ensemble des étapes permettant de générer les données a été réalisé dans W4M. Ce workflow est applicable à différents jeux de données générés selon le même protocole expérimental. Ce workflow est détaillé en annexe 2.

La seconde étape de filtration a pour objectif de purger la liste de variables brutes obtenues afin de conserver uniquement des variables d'intérêt, c'est-à-dire des variables ne correspondant pas à du bruit de fond généré lors de la mesure et pouvant être intégrées par erreur. Cette étape de filtration nécessite une adaptation de la séquence analytique en amont. Il est en effet nécessaire, pour une analyse non ciblée, d'ajouter plusieurs échantillons tels que des échantillons « contrôle qualité » (QC). Ces échantillons QC doivent être représentatifs de tous les échantillons injectés lors de l'analyse : pour cela un faible volume de chaque échantillon est prélevé puis mélangé pour former les échantillons QC. Plusieurs stratégies de filtration peuvent alors être utilisées à l'aide de cet échantillon :

- Les QC sont injectés régulièrement tout au long de l'analyse, ils permettent alors de suivre les variations de mesure de l'appareil au cours du temps sur le même échantillon et ainsi de les corriger.
- Tous les échantillons QC générés au cours de l'analyse peuvent aussi mettre en évidence certains ions possédant une forte variabilité dans ces échantillons. Ces ions peuvent être gênants et difficile à interpréter dans les échantillons biologiques. Il est en effet anormal d'avoir une grande variabilité pour une variable provenant d'un même échantillon.
- L'utilisation d'échantillons QC dilués peut également permettre d'identifier des pics « artefacts », dont l'intensité n'est pas corrélée avec la dilution.

- D'autres échantillons QC peuvent être créés comme par exemple un QC avec les échantillons blancs ne contenant pas de cellules. C'est à dire avec des échantillons ayant subi le même processus de préparation pour la métabolomique, mais ne possédant en théorie aucun métabolite. Cet échantillon QC_{blanc} permet alors de supprimer les variables provenant d'une éventuelle pollution introduite lors de la préparation des échantillons ou provenant des solvants utilisés lors de l'analyse.

Ainsi, tous ces échantillons ont permis de filtrer des faux positifs qui sont particulièrement nombreux en spectrométrie de masse non ciblée et qui peuvent biaiser l'interprétation des résultats. L'ensemble des paramètres utilisés pour ces filtrations et un exemple sont détaillés en annexe 2.

2.2.3 L'adaptation des protocoles pour la combinaison des protocoles

Lors de cette thèse, les analyses métabolomiques ciblées et non ciblées détaillées précédemment ont été combinées sur la même séquence analytique en spectrométrie de masse. En effet, pour les métabolites polaires, l'analyse des acides aminés et celle des métabolites énergétiques sont réalisées avec l'utilisation d'instruments analytiques de haute résolution, respectivement en mode d'ionisation positif et négatif. Stratégiquement, afin d'observer un maximum de composés en métabolomique non ciblée, les deux modes d'ionisations sont généralement étudiés. Ainsi, les séquences analytiques mises en place ont été adaptées pour obtenir les concentrations ou abondances relatives des métabolites ciblées ainsi que pour observer les variations d'autres ions en métabolomique non ciblée.

En pratique, les échantillons de la gamme étalon permettant d'obtenir la concentration absolue des composés ciblés ont été analysés deux fois (en début et en fin de séquence), en cas de problème analytique, pouvant

survenir lorsqu'il y a de nombreux échantillons analysés. L'ordre d'injection des échantillons a été randomisé tout au long de l'analyse. Des échantillons QC_{échantillons} et QC_{blanc} ont été introduits tous les 10 échantillons afin de suivre de manière régulière le comportement de l'appareil de mesure au cours du temps. Une dilution du QC_{échantillons} par 2, 4 et 8 a aussi été réalisée et ces échantillons ont été injectés en début de séquence analytique afin de pouvoir filtrer les variables dont l'intensité n'est pas corrélée avec la dilution, comme expliqué précédemment.

Les deux parties suivantes correspondent aux différents travaux réalisés au cours de cette thèse. Dans une première étape, le travail a été centré sur l'optimisation de plusieurs étapes clés de l'analyse métabolomique. Dans une deuxième phase, ces développements ont été appliqués pour l'étude des effets métabolomiques du PFOA par métabolomique.

**3. Optimisation des étapes
clés de l'analyse
métabolomique pour l'étude
des effets métaboliques
globaux**

L'exposition aux contaminants alimentaires est souvent une exposition chronique, et ses effets peuvent être difficiles à mettre en évidence. En particulier, c'est le cas pour les effets perturbateurs métaboliques, qui sont des perturbateurs endocriniens fortement suspectés d'impacter les équilibres métaboliques. Ces effets, souvent exprimés sur le long terme, suite à une exposition périnatale, sont difficiles à cerner, pour le moment, sur la base de systèmes d'essai *in vitro*. De plus, comme pour d'autres xénobiotiques, les modalités d'exposition (mélanges ; cofacteurs d'exposition : stress, âge, traitements médicamenteux...) et de sensibilité (variabilité individuelle innée ou acquise) sont complexes. Par conséquent, les effets de ces composés peuvent être reflétés par une modulation des concentrations d'un ensemble de métabolites biomarqueurs, mais dont les concentrations sont également susceptibles d'être modulées par d'autres facteurs intrinsèques ou extrinsèques. Pour pouvoir mettre en évidence les effets spécifiques de ces perturbateurs, il est nécessaire de limiter la variabilité générée par l'ensemble du protocole expérimental de l'analyse métabolomique afin de ne pas masquer les effets recherchés. Il existe de nombreuses sources de variabilité dans une étude métabolomique. Par exemple, il est possible d'introduire de la variabilité expérimentale, avec des conditions d'expérimentations qui ne sont pas rigoureusement identiques entre les différents réplicas ou batchs, par exemple des manipulateurs différents ou un timing de mesure différent. Il est aussi possible d'introduire de la variabilité lors de la préparation et du traitement des échantillons, c'est-à-dire lors l'arrêt du métabolisme cellulaire, de la collecte des cellules ou de l'extraction des métabolites. La variabilité liée au modèle cellulaire peut aussi poser certains problèmes tels que la phase du cycle cellulaire ou la croissance qui impacte le nombre de cellules au moment de l'arrêt du métabolisme cellulaire. Il existe des méthodes statistiques pour tenir compte de ces nombreuses sources de variabilité et essayer de la limiter au maximum. Mais ces méthodes statistiques sont souvent insuffisantes pour corriger la totalité de la variabilité introduite.

Il est donc fondamental de prendre en compte les problèmes de variabilité dans les analyses métabolomiques, pour optimiser la qualité des résultats obtenus. Dans ce travail de thèse, plusieurs travaux ont porté sur ce point critique pour les études de toxicologie. Nous avons spécifiquement cherché à faire progresser nos recherches sur ce point, dans le contexte particulier de l'utilisation de la métabolomique en toxicologie alimentaire. Pour cela, deux études ont été réalisées pour essayer de limiter la variabilité en métabolomique sur modèles *in vitro*. Une première étude a été réalisée sur l'optimisation des étapes **d'arrêt du métabolisme** cellulaire et des conditions **d'extraction des métabolites**. Une seconde étude a été focalisée sur le modèle cellulaire afin d'évaluer **l'impact du passage cellulaire** lors des études de métabolomique. Pour finir, un contaminant alimentaire peut affecter de nombreuses voies métaboliques. Ceci implique l'utilisation de plusieurs méthodes différentes pour couvrir l'ensemble des voies métaboliques pouvant être affectées, ce qui est exigeant en terme de temps et de matériel biologique. C'est pourquoi, une troisième étude a été réalisée afin **d'optimiser la couverture métabolomique** avec la mise en place d'un protocole permettant de réaliser des analyses métabolomiques et lipidomiques sur un même échantillon.

3.1 Optimisation du protocole de collecte et de préparation des échantillons cellulaires

3.1.1 Introduction et problématique

Lors d'une expérience de métabolomique sur des cellules adhérentes, l'étape d'extraction et de récupération des métabolites est très importante. Les différentes approches d'extraction et d'arrêt du métabolisme cellulaire utilisées dans la littérature sur des modèles de cellules adhérentes sont résumées à la figure 11. Lors de cette étape, il existe plusieurs points essentiels à prendre en compte pour ne pas introduire de biais dans l'analyse des données :

- Le détachement des cellules du support est un point pouvant poser des difficultés. Il existe deux principaux protocoles de détachement des cellules : l'utilisation de la trypsine, qui est une enzyme capable de digérer les protéines permettant la fixation des cellules sur le support, ou l'utilisation d'un grattoir permettant de décoller les cellules du support mécaniquement (Dettmer et al. 2011). Plusieurs études ont démontré que l'utilisation de la trypsine pouvait aboutir à des modifications importantes des cellules (Teng et al. 2008; Dettmer et al. 2011). Ceci peut donc induire des modifications du métabolome en raison du stress cellulaire et des perturbations structurelles et protéiques dans les cellules. Pour ces raisons, l'utilisation d'un grattoir semble préférable afin de garder les cellules dans un état plus physiologique et limiter l'apparition de biais.
- Le choix des solvants d'extraction des métabolites tels que l'acétonitrile, le méthanol, l'eau ou autres solvants possédant des polarités différentes est aussi un paramètre important. Pour l'extraction de métabolites polaires, l'utilisation de solvants de forte polarité tels que l'eau est favorisée. Au contraire, pour l'extraction de métabolites moins polaires, il est préférable d'utiliser des solvants dont la polarité est moindre tels que le dichlorométhane. Il est aussi possible de combiner l'utilisation de plusieurs solvants afin de couvrir

une gamme de polarité plus large pour les métabolites. L'un des défis en métabolomique est la mesure simultanée et non biaisée d'un maximum de composés. Cependant, le problème majeur est la grande diversité du métabolome qui englobe des molécules possédant des paramètres physico-chimiques très variés. De nombreuses études ont comparé l'extraction de métabolites avec l'utilisation de plusieurs solvants et mélanges de solvants. Ces études ont aussi fait varier certains paramètres, tels que la température ou le pH afin d'augmenter la stabilité des métabolites détectés et maximiser le nombre de variables mesurées (Rabinowitz and Kimball 2007; Sellick et al. 2010; Bi et al. 2013). D'après ces études, il apparaît que l'utilisation d'un mélange de solvants froids parfois acidifiés semble souvent être optimal pour la récupération des métabolites endogènes des cellules adhérentes. En effet, d'après Bi et ses collaborateurs (Bi et al. 2013), un mélange méthanol/chloroforme/H₂O comme solvant d'extraction semble plus adapté en comparaison des autres solvants ou mélange de solvants testés pour récupérer le plus grand nombre de métabolites intracellulaires (4 960 variables intracellulaires) avec la meilleure reproductibilité. Rabinowitz et ses collaborateurs ont démontré qu'un mélange acétonitrile/méthanol/eau acidifié est optimal pour la récupération des métabolites avec une minimisation de la dégradation des composés phosphorylés et une meilleure extraction des nucléotides (Rabinowitz and Kimball 2007). L'acidification des solvants permet en effet de stopper l'activité enzymatique et de limiter la dégradation ou la modification rapide de certains métabolites (Shryock et al. 1986). En résumé, dans ces études, la comparaison entre différents solvants d'extraction a montré que chaque mélange présente des avantages et des inconvénients pour différentes classes de métabolites, notamment en raison de leurs propriétés chimiques et physiques très différentes. Les résultats obtenus dépendent aussi du modèle utilisé, car chaque

modèle possède un métabolome différent. Ceci va influencer le choix de la solution d'extraction utilisée. Au contraire, l'utilisation de solvants chauds ne semble pas être optimale car certains métabolites sont thermosensibles et peuvent être dégradés lors de l'extraction (Villas-Bôas et al. 2005). Il n'existe donc pas de mélange de solvants connu permettant de garantir que l'on observe l'entièreté du métabolome dans un modèle.

- Le lavage des cellules est un point très important souvent sous-estimé lors de l'arrêt du métabolisme cellulaire. En effet, avant d'introduire le solvant ou le mélange de solvants pour bloquer le métabolisme des cellules, il est nécessaire d'enlever le milieu extracellulaire utilisé pour la culture des cellules. Ces milieux sont généralement très riches en acides aminés, glucose et autres composés nécessaires à la croissance des cellules. Cependant, ces métabolites peuvent aussi être présents dans les cellules, un mauvais lavage aboutit donc à une contamination des contenus intracellulaires récoltés et par conséquent à une mesure faussée des concentrations de métabolites intracellulaires. Il est donc très important de séparer efficacement ce milieu de culture des métabolites endogènes.
- Le protocole d'arrêt du métabolisme cellulaire est aussi un point très critique en métabolomique. Cette étape est aussi appelée « quenching » et consiste à arrêter le plus rapidement possible toute activité enzymatique dans les cellules, dans le but de figer le métabolome à un moment donné. En effet, certains métabolites comme les composés phosphorylés peuvent se dégrader ou être très rapidement modifiés par des processus enzymatiques comme lors d'un changement de température (Weibel et al. 1974). Certaines voies métaboliques sont plus sensibles que d'autres, c'est notamment le cas pour la voie du métabolisme central du carbone dont les enzymes ont une activité très rapide, ceci est moins le cas pour le métabolisme des lipides par exemple. L'étape de quenching doit donc

être répétable et rapide afin d'observer le métabolisme dans son état physiologique le moins perturbé possible et de limiter l'introduction de biais lors de l'analyse des échantillons.

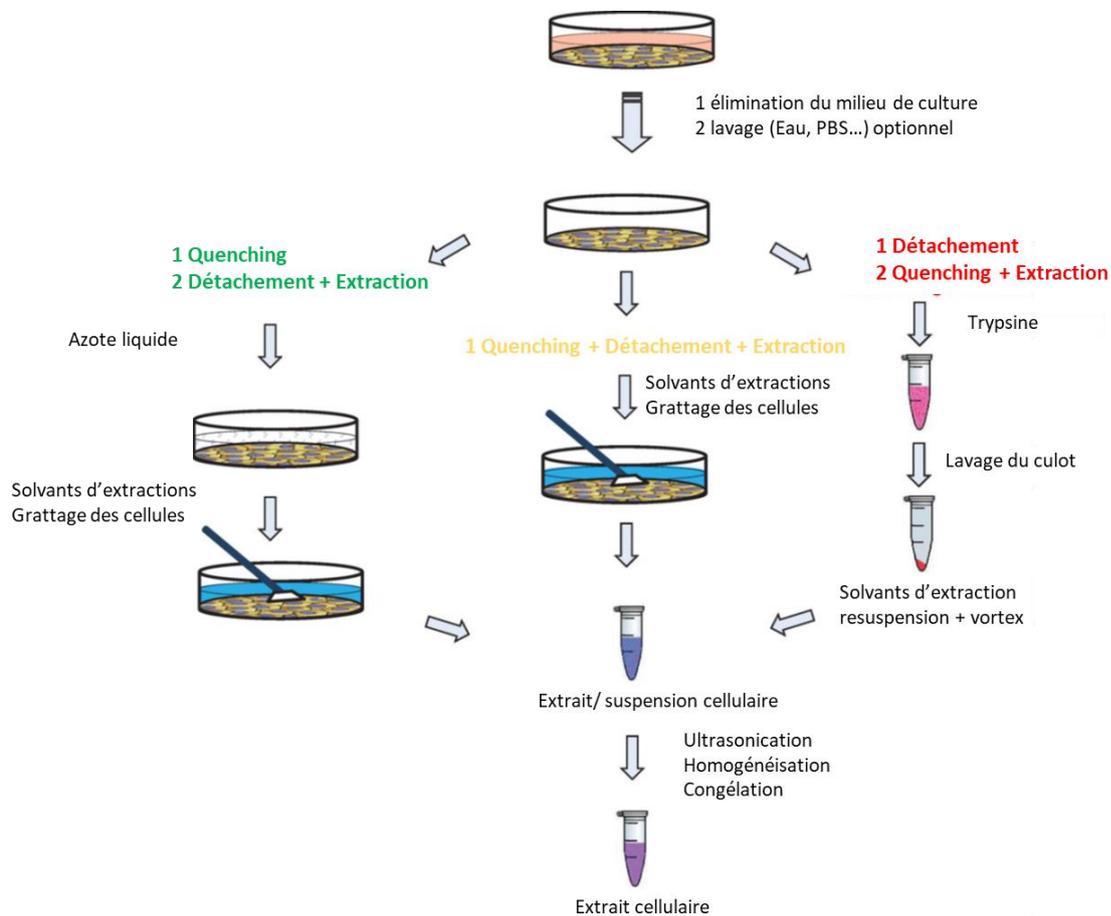


Figure 11 : Schéma provenant d'un article de revue (León et al. 2013) traduit en français, et illustrant et résumant les différentes approches d'arrêt du métabolisme cellulaire et d'extraction utilisées dans les analyses métabolomiques sur cellules adhérentes.

Toutes les problématiques détaillées ci-dessus correspondent à différentes étapes permettant la génération des échantillons pour la métabolomique. Il existe de nombreux protocoles, chacun possédant des avantages et des inconvénients pour la récupération de certains métabolites et pour l'introduction de variabilité dans les mesures. Une étude de la bibliographie comparant différentes méthodes utilisées pour la génération des échantillons en métabolomique pour différentes matrices (urine, sang, fèces, tissu, cellules) a conduit à la publication d'une revue à laquelle nous avons participé (Smith et al. 2020).

Lors de ce travail de thèse, une importance particulière a été portée sur la diminution de la variabilité introduite au cours des différentes étapes du protocole de collecte des échantillons et d'extraction des métabolites. Jusqu'à présent, le protocole utilisé pour stopper le métabolisme cellulaire sur les cellules HepaRG, était, dans l'équipe d'accueil, un protocole classiquement utilisé dans ce domaine. L'ensemble de ce protocole est détaillé dans la partie 3.1.2.a et est illustré dans la figure 12. Cependant, ce protocole semble posséder certaines limites, avec notamment la présence d'une variabilité relativement importante et des contaminations par le milieu extracellulaire pour les métabolites mesurés. Un protocole d'arrêt du métabolisme cellulaire a récemment été développé par Martano et ses collaborateurs (Martano et al. 2015) : ce protocole, particulièrement adapté pour l'étude du métabolome de cellules adhérentes, est basé sur la rapidité d'exécution, pour accélérer l'étape de quenching, et l'efficacité du lavage, pour réduire la contamination. Pour ces raisons, nous avons introduit et adapté ce protocole pour l'exploration du métabolome des cellules HepaRG, dans le cadre de cette thèse, avec l'objectif de diminuer la variabilité des données. Afin d'observer l'apport de ce nouveau protocole (nommé "protocole fast-quenching"), une comparaison a été réalisée avec le protocole utilisé jusqu'à maintenant dans l'équipe pour les expériences

de métabolomique, ce protocole est nommé "protocole standard" dans la suite de cette partie.

3.1.2 Matériel et méthodes

a. Le protocole standard

Le protocole standard (Figure 12A) consiste à déposer les cellules dans une plaque 6 puits. Après 24h de dépôt puis suite à une période d'exposition au milieu contenant le composé testé, le milieu extracellulaire est retiré par une aspiration. Puis, 2 mL de PBS sont utilisés pour rincer le puits. Ensuite 2 mL de solution froide (5°C) d'arrêt du métabolisme cellulaire, composée d'eau et d'acétonitrile aux proportions 90/10 (v/v), sont ajoutés dans chaque puits. Les cellules sont décrochées du support à l'aide d'un grattoir et le mélange contenant les métabolites endogènes est transféré dans un tube Eppendorf de 15mL. Les tubes sont ensuite exposés environ 30 secondes à des ultrasons afin d'améliorer l'extraction des métabolites. Puis les échantillons sont successivement déposés dans la glace puis dans l'azote liquide pour terminer l'extraction. Les échantillons congelés sont ensuite stockés à -80°C jusqu'à évaporation. Ce protocole standard, communément utilisé dans l'équipe, peut être réalisé par un seul expérimentateur. Cependant, il faut environ 2 à 3 minutes par puits pour arrêter le métabolisme des cellules.

b. Le protocole de fast-quenching

Le protocole de « fast-quenching » développé par Martano et ses collaborateurs (Martano et al. 2015) a été mis en place et adapté afin de mieux correspondre avec les techniques analytiques utilisées (Figure 12B). Le protocole consiste à déposer les cellules sur une lamelle de verre (30 mm de diamètre) préalablement déposée dans chaque puits d'une plaque 6 puits. Après 24h d'incubation puis après une période d'exposition au milieu contenant le composé d'étude, la plaque 6 puits est placée sur une plaque chauffante (37°C) afin de limiter au maximum le stress cellulaire pouvant subvenir à la suite d'un changement brutal de température. La lamelle de verre est alors saisie et plongée à plusieurs reprises dans un bain d'eau milliQ sous agitation dans le but d'éliminer le milieu extracellulaire restant. Par la suite, la lamelle de verre est déposée dans une nouvelle plaque 6 puits contenant 4 mL de solution de quenching composée d'acétonitrile/méthanol/eau acidifiée avec 0.1% acide formique aux proportions 2/2/1 (v/v/v). Comme pour le protocole standard, un grattoir est utilisé pour récupérer les cellules et la suspension contenant les métabolites est ensuite prélevée dans un tube Eppendorf de 15mL. Les tubes sont ensuite exposés 30 secondes à des ultrasons, puis sont transférés successivement dans la glace et l'azote liquide, et sont stockés à -80°C jusqu'à évaporation. La spécificité du protocole est la présence d'un minimum de 5 manipulateurs pour favoriser la vitesse d'exécution de chaque étape, ce qui permet d'arrêter le métabolisme des cellules en 15 à 20 secondes pour chaque puits. Chaque manipulateur est affilié à un rôle spécifique :

- **Expérimentateur 1** : Transfert de la plaque 6 puits contenant les cellules de l'incubateur à la plaque chauffante. Changement de l'eau milliQ de lavage après chaque puits.
- **Expérimentateur 2** : Prise de la lamelle de verre dans le puits, lavage dans le bain d'eau milliQ et dépôt dans le puits de la nouvelle plaque 6 puits contenant la solution de quenching.
- **Expérimentateur 3** : Grattage des cellules déposées sur la lamelle de verre.
- **Expérimentateur 4** : Récupération de la solution de quenching contenant les métabolites extraits.
- **Expérimentateur 5** : gestion du transfert de l'échantillon dans le bain à ultrason, puis dans la glace, puis dans l'azote liquide avec respect du temps de chaque étape.

Il est à noter que le fait de parfaitement décrire et chronométrer chaque étape (par exemple, 10 "plongées" de la lamelle de verre dans la solution de rinçage), ainsi que d'avoir toujours le même expérimentateur à chaque "poste" permet d'améliorer la reproductibilité entre les différentes expérimentations.

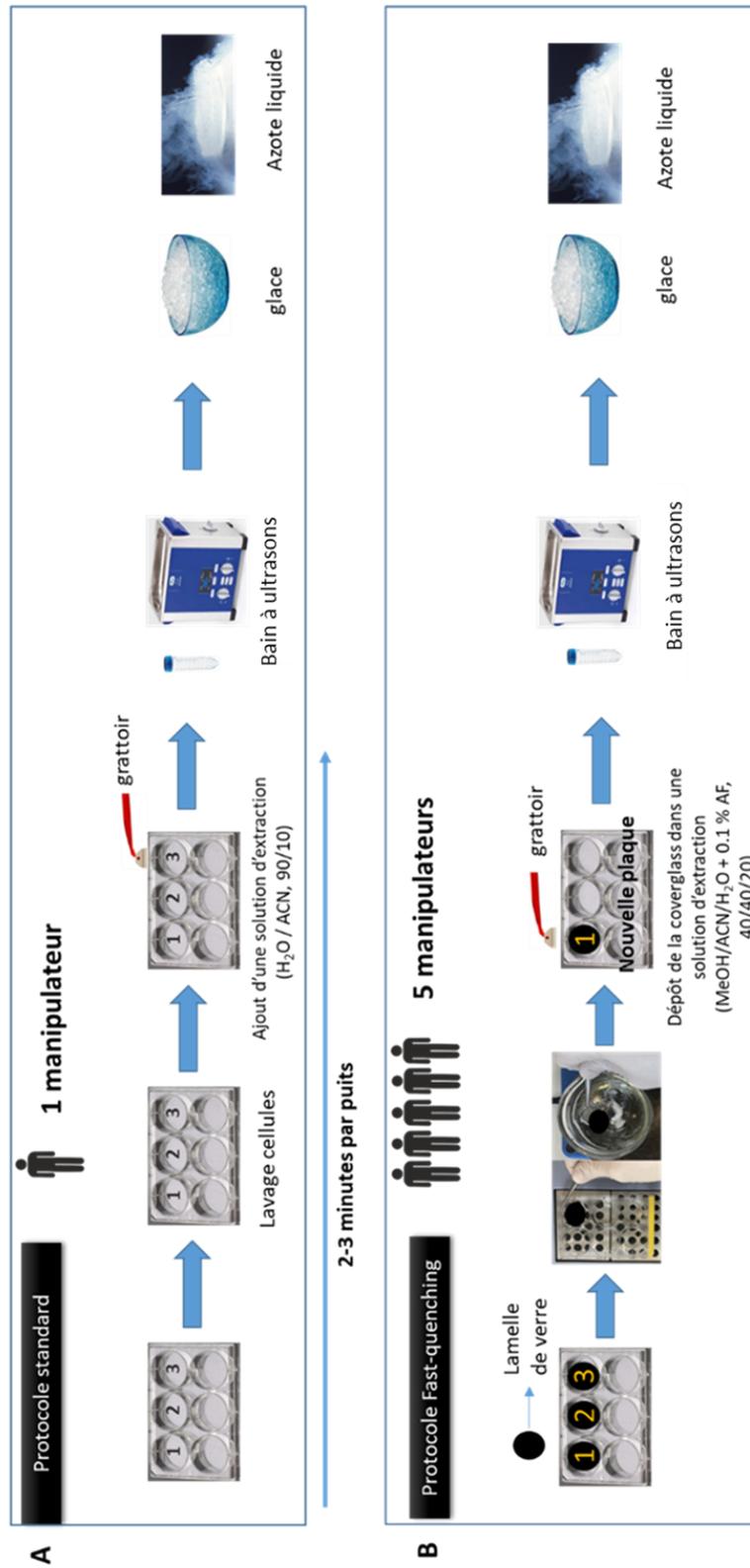


Figure 12 : Protocole standard (A) et protocole de fast-quenching (B) permettant l'arrêt du métabolisme cellulaire.

c. Plan d'expérience et méthodes analytiques

Afin de comparer ces deux protocoles, les cellules n'ont été exposées à aucune substance d'essai dans l'ensemble des expériences réalisées. Plusieurs techniques analytiques ont été utilisées au cours de 2 expérimentations (figure 13). La SM ciblée a été utilisée pour mesurer les concentrations absolues d'un ensemble prédéfini de métabolites énergétiques et d'acides aminés : cette étude a permis d'évaluer l'impact du protocole sur la variabilité des concentrations mesurées. Ces analyses métabolomiques ciblées ont été réalisées sur la plateforme MetaToul au TBI (UMR5504, UMR792). Pour les analyses ciblées réalisées, l'ensemble des paramètres est détaillé en annexe 1. Une seconde expérience a été réalisée avec un plus grand nombre d'échantillons en RMN, suivie par de la SDM non ciblée en mode d'ionisation positive et négative sur les mêmes échantillons. Ces analyses RMN et de SM non ciblée ont été réalisées sur la plateforme MetaToul Axiom à l'unité Toxalim d'INRAE. Le but de cette seconde expérience était d'observer l'impact du protocole sur la variabilité d'un plus grand nombre de métabolites et sur d'autres techniques analytiques. Ainsi, pour l'ensemble des expériences réalisées, 500 000 cellules ont été déposées dans chaque puits dans 4 mL de milieu pendant 24h. Par la suite, le milieu de culture a été changé par 2 mL d'un milieu identique sans rouge de phénol et les cellules ont été récoltées après 24h suivant chaque protocole. Des échantillons contrôles « blancs » sans cellules ont par ailleurs été réalisés en parallèle pour chaque protocole pour évaluer la contamination par le milieu extracellulaire.

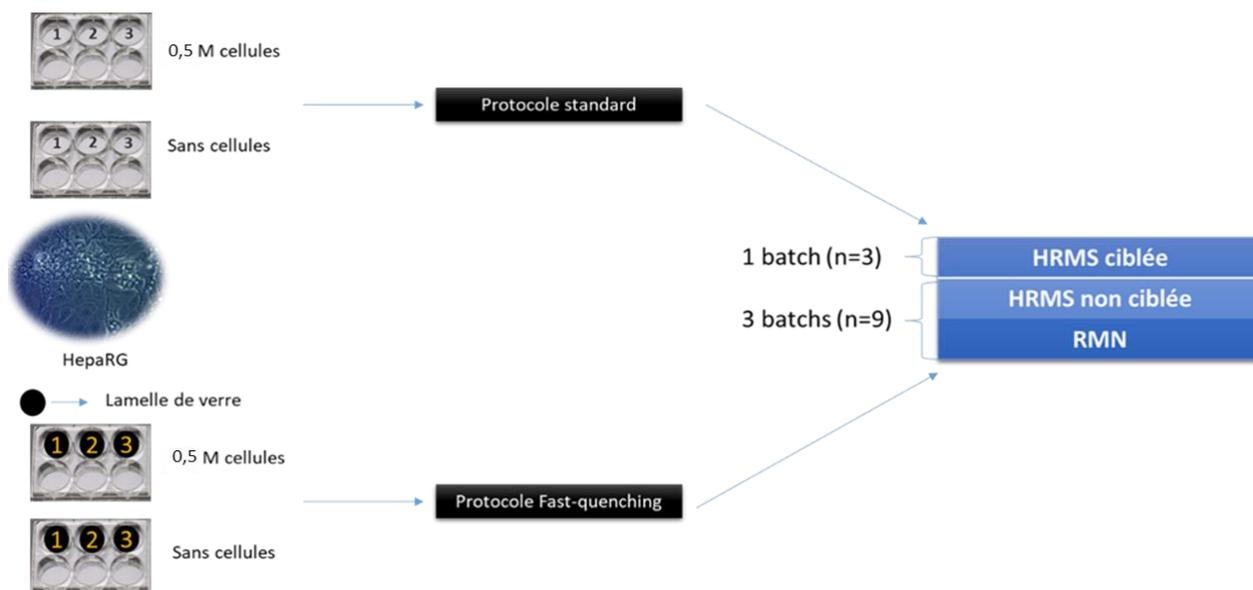


Figure 13 : Schéma résumant les différentes expérimentations réalisées afin de comparer le protocole standard et le protocole de fast-quenching.

d. Analyses par spectrométrie de masse non ciblée

Les analyses non ciblées ont été réalisées en mode positif et négatif par chromatographie liquide (ACQUITY, Waters) couplée à un spectromètre de masse à temps de vol QToF (Waters) équipé d'une source d'ionisation électrospray. Les analyses de SDM ont été effectuées avec une résolution de 15 000 en mode centroïde entre 80 et 800 m/z. Concernant la phase stationnaire, les échantillons ont été injectés sur une colonne Hypersil Gold (Thermo Scientific) (100 mm × 2,1 mm ; taille de particules de 1.9 µm). Concernant les phases mobiles, le solvant A était un mélange H₂O/CH₃OH/CH₃CO₂H 95/5/0.1 (v:v:v) et le solvant B était de CH₃OH/CH₃CO₂H 100/0.1 (v:v) à un débit de 250 µL.min⁻¹. Le gradient du solvant B utilisé variait comme suit : de 0 à 30 minutes : 0% à 100% de B (gradient linéaire), de 30 à 34 minutes : 100% de B, de 35 à 39 minutes : 0% de B. Le volume de l'injection était de 10 µL.

e. Analyses par RMN

Les spectres RMN ont été obtenus à 300 K sur un spectromètre Bruker Avance III HD (Bruker, Karlsruhe, Allemagne) opérant à la fréquence de 600.13 MHz pour le proton, et équipé d'une cryosonde 5mm ^1H - ^{13}C - ^{15}N - ^{31}P avec détection inverse, et d'un passeur d'échantillons SampleJet réfrigéré. Les spectres ont été enregistrés en utilisant la séquence noesypr1D permettant de supprimer le signal de l'eau, avec un temps de mélange de 100 ms. 128 expériences ont été collectées sur 32000 points en utilisant une largeur spectrale de 20 ppm, un délai de relaxation de 5 s et un temps d'acquisition de 1.36 s. Le signal a été multiplié par une fonction exponentielle (LB=0.3 Hz) avant la Transformée de Fourier. Les spectres ont été ensuite phasés et calibrés manuellement, la ligne de base a été corrigée, en utilisant le logiciel Topspin (V3.5, Bruker Biopspin, Allemagne).

f. Analyses statistiques

Concernant les analyses métabolomiques en SDM ciblée, les moyennes et les coefficients de variation des concentrations ou abondances relatives obtenues pour chaque protocole ont été comparées à l'aide d'un test de Student. Les différences étaient considérées comme significatives lorsque la valeur p était inférieure à 0,05. De plus, des analyses en composantes principales ont été réalisées pour les données obtenues par RMN et par SDM non ciblée pour observer la dispersion des données entre les deux protocoles.

3.1.3 Résultats et discussion

a. La contamination dans les échantillons blancs

Parmi les 54 métabolites mesurés, 32 n'ont pas été détectés dans les échantillons "blancs" (échantillons ne contenant pas de cellules), quel que soit le protocole. Bien qu'en faible quantité, 22 métabolites ont été détectés dans les "blancs" pour les deux protocoles, et 10 d'entre eux ont été détectés uniquement pour le protocole standard.

La comparaison des quantités de métabolites détectés dans les échantillons "blancs" *versus* avec cellules est représentée à la figure 14 pour l'isoleucine et pour l'acide 2-hydroxyglutarique. Ces deux métabolites ont été choisis car ils sont représentatifs de ce que l'on observe pour les acides aminés et les métabolites énergétiques respectivement. Pour l'acide 2-hydroxyglutarique, aucune différence significative n'a été obtenue concernant la quantité de métabolite retrouvée dans les blancs entre les 2 protocoles. Pour l'isoleucine, une quantité significativement inférieure de métabolite a été détectée avec le protocole de fast-quenching par rapport au protocole standard. Ces observations sont retrouvées pour nombre d'autres acides aminés : pour 11 d'entre eux une contamination significativement supérieure a été observée pour le protocole standard. Contrairement à l'acide 2-hydroxyglutarique, les acides aminés sont fortement concentrés dans le milieu de traitement des cellules HepaRG, c'est pourquoi il est fortement probable que l'augmentation de la quantité de métabolites observée dans les blancs pour le protocole standard corresponde en réalité à des résidus de métabolites issus du milieu extracellulaire.

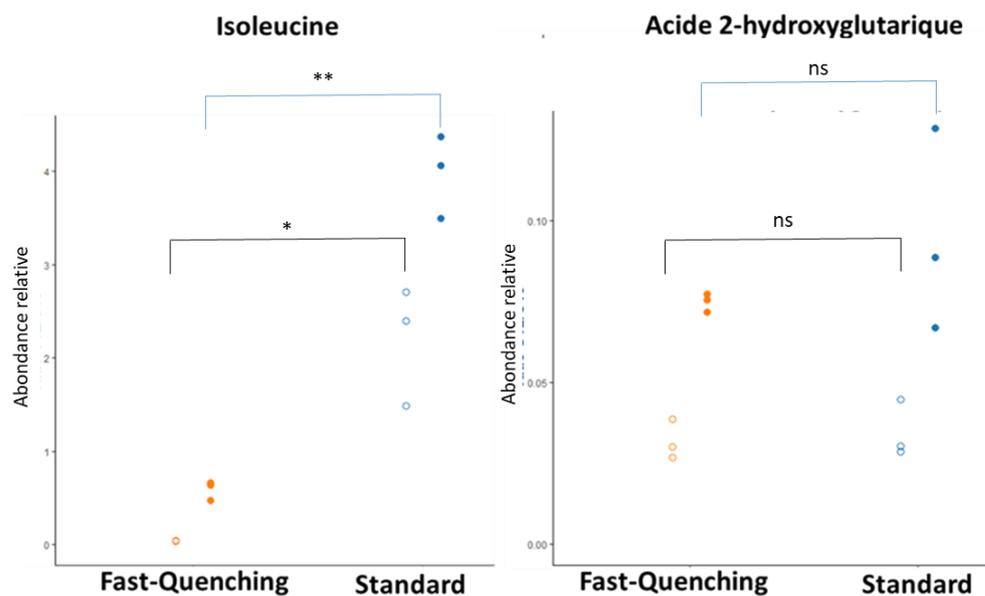


Figure 14 : Comparaison des quantités mesurées de l'isoleucine et de l'acide 2-hydroxyglutarique dans les échantillons avec et sans cellules entre le protocole de fast-quenching et le protocole standard. Les échantillons avec cellules sont représentés avec (•) et les échantillons sans cellules avec (o). Les abondances relatives obtenues par spectrométrie de masse ciblée ont été utilisés pour ces graphiques (n=3). Les moyennes ont été comparées à l'aide d'un test de Student (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Les résultats obtenus en RMN confirment cette plus forte contamination pour le protocole standard, comme détaillé à la figure 15, pour laquelle les spectres RMN sans cellules ont été intégrés avec une largeur de 0,02 ppm. Les pics des solvants de l'extraction ont été exclus des données et la somme de chaque intégration a ensuite été réalisée. Une différence significative a été observée entre le protocole standard et le protocole de fast-quenching (p value = 0,0188) indiquant à nouveau que les spectres des échantillons sans cellules du protocole standard sont davantage pollués par des résidus du milieu extracellulaire que les spectres du protocole de fast-quenching. Ceci indique que les valeurs observées pour les échantillons avec cellules pourraient être surestimées pour le protocole standard, particulièrement pour les acides aminés et certains métabolites provenant du milieu extracellulaire. Ces résultats, obtenus en SDM ciblée et RMN, indiquent donc que le processus de lavage, avec l'utilisation de lamelle de verre, du protocole de fast-quenching est plus performant que le protocole standard.

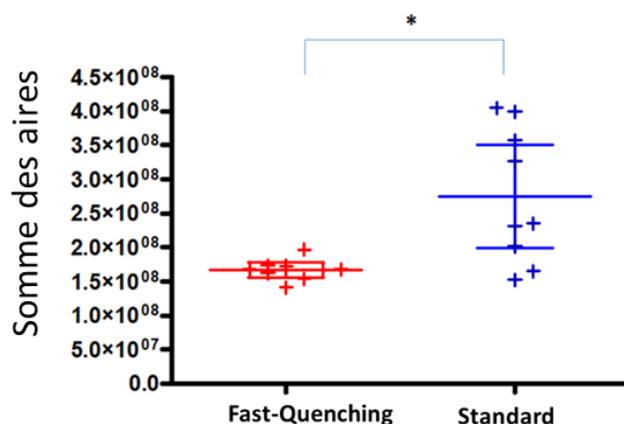


Figure 15 : Comparaison de la contamination des échantillons blancs sans cellules entre le protocole de Fast-Quenching et le protocole standard. Les spectres RMN des échantillons blancs sans cellules ont été découpés avec une largeur de 0,02 ppm sans normalisation. Les aires de chaque zone découpée ont été additionnées pour chaque spectre (n=9), les solvants utilisés ont été exclus du tableau de données. Les médianes ont été comparées à l'aide d'un test de Mann & Whitney (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001).

b. L'efficacité de l'extraction

De manière générale, pour les métabolites détectés, une contamination des blancs moins importante est observée avec le protocole fast-quenching.

Concernant les échantillons avec cellules, l'utilisation de la SDM ciblée a permis d'obtenir les abondances relatives ou absolues de 54 métabolites (18 acides aminés et 36 métabolites énergétiques) pour cette expérience. Il semble que le protocole standard permet de récupérer une plus grande quantité des métabolites ciblés en comparaison au protocole de fast-quenching. En effet, parmi les 48 métabolites en commun, 15 métabolites sont détectés avec des quantités similaires dans les deux protocoles (par exemple, l'acide 2-hydroxyglutarique, figure 14), alors que pour 28 métabolites, les quantités mesurées sont significativement supérieures dans le protocole standard par rapport au protocole de fast-quenching (par exemple, l'isoleucine, figure 14). Seulement 5 métabolites ont des quantités supérieures pour le protocole de fast-quenching (α -cétoglutarate, ATP, GDPman, UTP, asparagine). Cette différence entre les deux protocoles pourrait être expliquée par les différentes solutions d'arrêt du métabolisme qui ont été utilisées entre les deux protocoles. En effet, pour le protocole standard, une solution majoritairement aqueuse a été utilisée (90% H₂O), l'extraction des métabolites polaires est donc généralement meilleure. De plus, les valeurs plus élevées obtenues avec le protocole standard peuvent être liées aux fortes contaminations observées dans les blancs, ce qui surestime la concentration réelle du composé notamment pour les acides aminés. La vitesse d'exécution entre les deux protocoles peut aussi jouer un rôle important dans la détection des métabolites. Certains métabolites sont en effet rapidement métabolisés ou dégradés comme par exemple les métabolites possédant un groupement phosphate (Dietmair et al. 2010; Vijay Kapoore et al. 2017). Ce qui est en accord avec les observations pour les métabolites observés en plus grande quantité pour le protocole de fast-quenching.

c. La variabilité entre les deux protocoles

Afin d'observer la dispersion des valeurs entre les deux protocoles, les coefficients de variation de chaque métabolite mesuré en SDM ciblée ont été calculés pour chaque protocole. Pour les métabolites énergétiques, les résultats obtenus et représentés sur la figure 16A montrent que les coefficients de variation sont significativement plus faibles (p -value = 0,0002) pour le protocole de fast-quenching. Cependant, aucune différence significative n'a été observée pour les coefficients de variation des acides aminés (figure 16B). Cela peut s'expliquer par le fait que les métabolites énergétiques sont impliqués dans des réactions métaboliques ayant une cinétique très élevée et qui peuvent facilement varier si la récupération des cellules et l'arrêt du métabolisme ne se fait pas très rapidement (Gil et al. 2015). Le fait que la vitesse à laquelle on arrête le métabolisme soit plus longue et plus variable entre les échantillons pour le protocole standard peut entraîner des variations majeures de concentrations sur ces métabolites entre les échantillons. Cette observation n'est d'ailleurs pas retrouvée pour les acides aminés qui sont potentiellement plus stables.

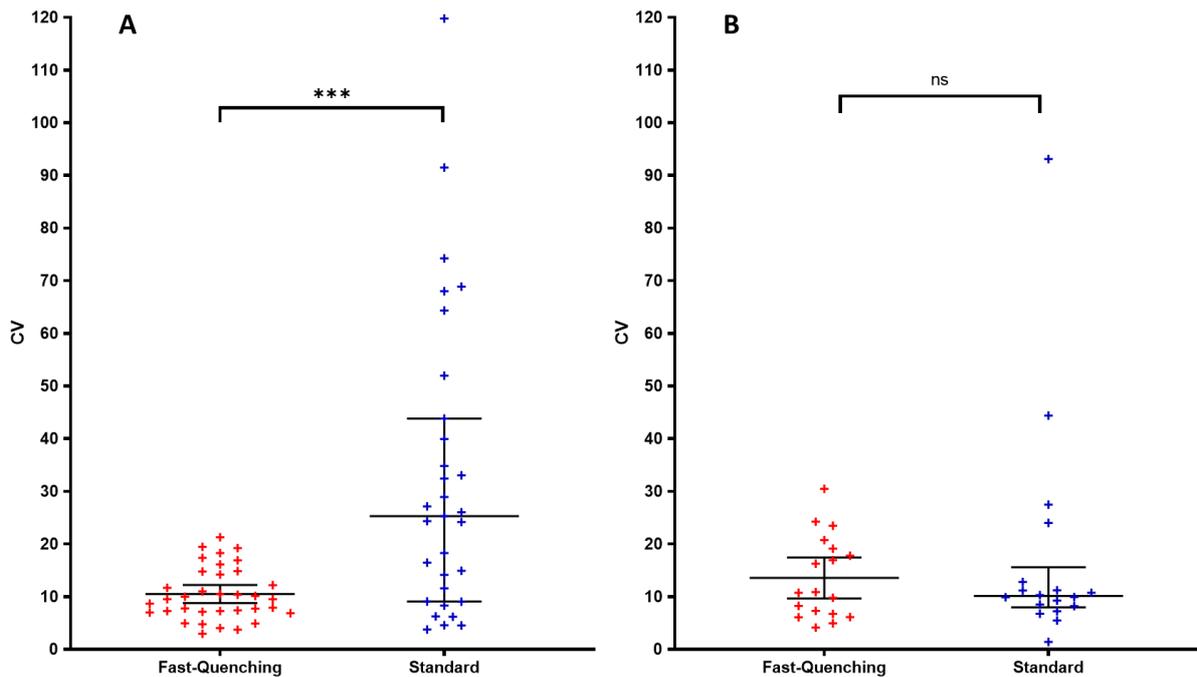


Figure 16 : Comparaison des coefficients de variation obtenus pour chaque métabolite mesuré entre les deux protocoles. Les coefficients de variation ont été obtenus en utilisant les moyennes des ratios $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ pour les métabolites énergétiques (A) et pour les acides aminés (B). Les moyennes et les écarts types sont représentés pour les deux protocoles. Les moyennes ont été comparées à l'aide du test de Student (***) $p < 0.001$).

De plus, nous avons aussi observé cette différence de variabilité sur les analyses en composantes principales obtenues avec les données de RMN (figure 17A), et de SDM non ciblée, en modes négatif (figure 17B) et positif (figure 17C). L'analyse en composantes principales est une analyse statistique non supervisée qui ne tient pas compte du groupe d'appartenance des échantillons, ce qui permet d'observer la variabilité obtenue de manière non biaisée pour chaque groupe d'échantillons. Comme on peut le voir sur ces ACP, l'axe 1 permet de séparer les deux protocoles, ce qui est probablement dû aux fortes différences observées dans la quantité de métabolites extrait avec les deux différentes solutions d'extraction. Cependant sur l'axe 2 des ACP, les nuages de points sont beaucoup plus regroupés pour le protocole de fast-quenching, indiquant une

variabilité inter-échantillons plus faible. À l'inverse, le nuage de points des échantillons provenant du protocole standard est très dispersé sur l'ACP, indiquant une variabilité plus élevée. Ces observations sont constatées pour la RMN, aussi bien que pour la SDM non ciblée en mode négatif (figure 17A et 17B). Cependant, elles semblent moins évidentes pour la SDM non ciblée en mode positif où la variabilité entre les deux protocoles semble équivalente (figure 17C). Cette observation peut être expliquée par la grande quantité de variables obtenues pour le protocole de fast-quenching par rapport au protocole standard (figure 17B). En effet, de nombreuses variables ont été détectées uniquement dans le protocole de fast-quenching, ces variables ont donc une valeur de 0 dans le protocole standard (par conséquent artificiellement homogène), ce qui va réduire la variabilité observée *via* le nuage de points de l'ACP.

Globalement, les résultats obtenus indiquent une plus faible variabilité dans les données obtenues pour le protocole de fast-quenching. Comme indiqué précédemment, ce protocole est basé sur la rapidité d'exécution pour arrêter le métabolisme cellulaire afin de limiter les dégradations et modifications enzymatiques de certains métabolites.

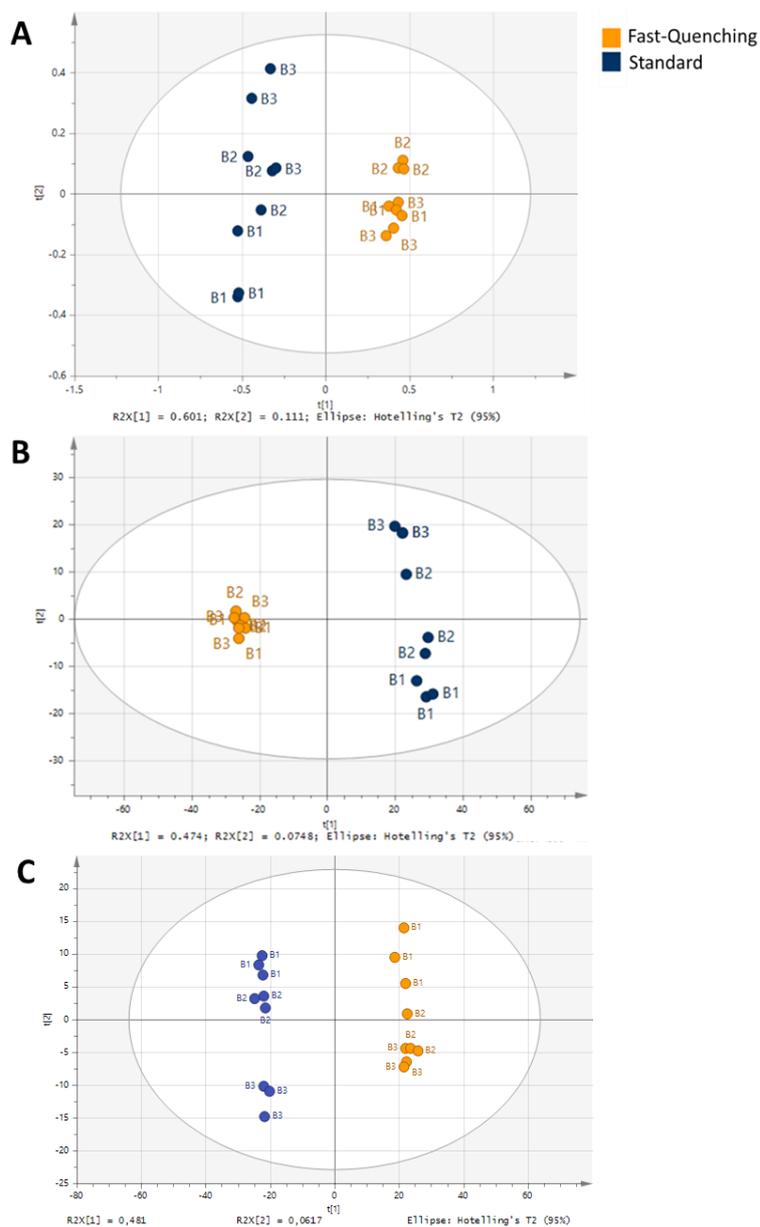


Figure 17 : Score plots des analyses en composantes principales réalisées sur les données de RMN (A), de spectrométrie de masse non ciblée en mode d'ionisation négative (B) et positive (C). Chaque spectre RMN a été découpé en buckets d'une largeur de 0,02 ppm puis chaque bucket a été normalisé par l'aire totale intégrée pour chaque spectre (n=9). Une standardisation Pareto a été effectuée pour l'analyse multivariée des données RMN. Une standardisation Pareto suivie d'une transformation logarithmique a été effectuée pour l'analyse multivariée des données de spectrométrie de masse. 463 variables ont été obtenues en RMN, 1099 et 696 variables ont respectivement été obtenues dans les modes positif et négatif en spectrométrie de masse non ciblée. Les répliques biologiques sont représentés par les étiquettes B1/B2/B3 correspondants aux 3 répliques biologiques.

d. Comparaison du nombre de variables détectées

Parmi ces métabolites mesurés en SDM ciblé, 48 ont été retrouvés en commun dans les deux protocoles, 5 métabolites ont été uniquement détectés dans le protocole de fast-quenching (Fructose-6-Phosphate, Glucose-6-Phosphate, Isocitrate, Mannose-6-phosphate, Phosphosérine) et 1 métabolite a été détecté uniquement dans le protocole standard (N-Acetylglucosamine-6-phosphate).

Les données obtenues en spectrométrie de masse non ciblée ont aussi permis de comparer les variables obtenues pour le protocole de fast-quenching et le protocole standard. Pour cela l'algorithme CAMERA (Collection of Algorithms for METabolite pRofile Annotation) a été utilisé sur les variables obtenues dans les deux modes d'ionisation. En effet, plusieurs variables différentes peuvent correspondre à un même métabolite avec par exemple des adduits différents (H^+ , Na^+ , K^+ , etc.)

Cet algorithme a permis de regrouper les ions issus d'un même métabolite lors de l'analyse et de les annoter (isotopes, adduit, etc...). Cela permet ainsi de réduire considérablement le grand nombre de variables obtenues pour estimer le nombre réel de métabolites observés. Comme on peut le voir sur la figure 18, la quantité de métabolites détectés avec l'algorithme est supérieure avec le protocole de fast quenching : pour le mode négatif, 150 métabolites ont été retrouvés uniquement dans le protocole de fast-quenching et 70 métabolites ont été retrouvés uniquement dans le protocole standard. Seulement 133 métabolites ont été retrouvés en commun pour les deux protocoles. Pour le mode positif, 273 métabolites ont été retrouvés dans le protocole de fast-quenching et 105 métabolites ont été retrouvés avec le protocole standard. Au total, 137 métabolites ont été trouvés en commun pour les deux protocoles.

Etant donné que le solvant d'extraction utilisé est différent dans les 2 protocoles, nous ne pouvons pas conclure si cette hausse du nombre de métabolites détectée est due au solvant utilisé ou à la rapidité du protocole

permettant de limiter la dégradation et la transformation enzymatique de certains métabolites. Plusieurs études ayant montré que la nature du solvant d'extraction pouvait modifier la récupération de métabolites, l'hypothèse d'un effet dû aux différences dans les solvants utilisés semble toutefois très probable (Shryock et al. 1986; Sellick et al. 2010; Bi et al. 2013).



Figure 18 : Diagramme de Venn comparant le nombre de métabolites extraits dans chacun des deux protocoles. L'algorithme CAMERA a été utilisé pour regrouper les différentes variables correspondant à un même métabolite dans le jeu de données. Les données ont été obtenues en spectrométrie de masse non ciblée avec un mode d'ionisation négative (A) et positive (B).

3.1.4 Conclusion

En conclusion, l'efficacité de l'extraction entre les deux protocoles est différente en fonction des métabolites. Le protocole standard semble extraire une plus grande quantité (abondance relative) pour la majorité des métabolites ciblés, ce qui peut être expliqué par l'utilisation de solutions d'arrêt du métabolisme cellulaire différentes. Chaque mélange de solvants possède des avantages et des inconvénients spécifiques pour la récupération des métabolites, en raison de leurs différentes propriétés physico-chimiques. La solution d'arrêt du métabolisme peut facilement être adaptée en fonction des métabolites que l'on souhaite cibler. Néanmoins, le protocole de fast-quenching semble extraire un plus grand nombre de métabolites. Cependant, nous ne pouvons pas conclure si cette hausse provient des différents solvants utilisés ou de la limitation la dégradation et la transformation enzymatique de certains métabolites. Pour cela, il serait nécessaire de réaliser une expérience supplémentaire avec des solutions d'arrêt du métabolisme cellulaire identiques.

Le protocole de fast-quenching présente plusieurs avantages par rapport au protocole standard : une contamination nettement diminuée a été observée avec ce protocole, ce qui reflète probablement une meilleure étape de lavage des cellules lors de l'arrêt du métabolisme cellulaire. Cette procédure permet de ne pas surestimer les quantités de métabolites mesurées lors d'une analyse quantitative. Elle permet aussi de limiter la suppression de variables lors des analyses non ciblées pour l'étape de filtration des blancs, ce qui est d'un grand intérêt pour maximiser le nombre de variables obtenues. Par sa vitesse d'exécution, le protocole de fast-quenching limite fortement la variabilité inter-échantillons en comparaison avec le protocole standard. Il est donc attendu que l'observation des métabolites endogènes des cellules corresponde davantage à la réalité qu'avec le protocole standard. Ceci permet donc de mieux voir les potentiels effets d'un composé d'intérêt lors d'une étude de toxicologie utilisant la

métabolomique. C'est pourquoi, ce protocole a été utilisé lors de cette thèse afin d'étudier les effets du PFOA en métabolomique.

3.2 Optimisation de l'utilisation du modèle cellulaire pour limiter la variabilité inter-échantillons

3.2.1 Introduction et problématique

Lors d'une expérimentation de métabolomique, il existe de nombreuses matrices fréquemment utilisées, à partir de modèles *in vitro* ou *in vivo*. Dans le cadre de l'évaluation du risque des substances chimiques sur la santé humaine, de plus en plus de modèles *in vitro* sont utilisés pour limiter les contraintes liées à la disponibilité de matériel biologique et pour répondre à des exigences éthiques (diminution de l'utilisation des animaux de laboratoire) Les cellules HepaRG sont utilisées dans des projets européens de toxicologie (H2020) (Legler et al. 2020) et des programmes de criblage haut débit tel que Tox21 aux Etats-Unis (Merrick et al. 2015). Les cellules HepaRG sont généralement cultivées dans des flasques. Elles se multiplient et occupent un maximum de place dans la flasque, jusqu'à atteindre 100 % de la place disponible, c'est ce qu'on appelle la confluence. On appelle « repiquage des cellules » ou « passage cellulaire », l'étape de décollement des cellules de la flasque afin de les diviser à nouveau dans d'autres flasques pour poursuivre la culture. Cette étape est nécessaire, car le dépassement d'un pourcentage précis de confluence (variable selon la lignée cellulaire), est souvent létal pour la plupart des modèles cellulaires. Également, cela permet d'amplifier les cellules pour atteindre une quantité suffisante pour une expérience. Le « temps de conservation » d'une lignée cellulaire est souvent lié au nombre de repiquages (ou passages) réalisés à partir de leur réception au laboratoire. Concernant les cellules HepaRG cultivées au laboratoire, elles sont généralement utilisées entre les passages P12 et P20. Il a été démontré des niveaux comparables d'expression des cytochromes P450 et des récepteurs nucléaires dans les cellules HepaRG différenciées lors d'une comparaison des différents passages jusqu'au passage P20 (Anthérieu et al. 2010; Adam et al. 2020).

C'est pourquoi l'utilisation de ces cellules sur des passages élevés est fortement déconseillée par la société responsable de la commercialisation des cellules HepaRG.

Il existe aussi des études sur d'autres lignées cellulaires qui ont montré que les caractéristiques d'une lignée cellulaire pouvaient être modifiées en fonction des différents passages cellulaires. Il a été démontré par exemple des modifications de la morphologie des cellules Caco-2 ainsi que des différences d'activité de certaines enzymes entre un nombre de passages faible et élevé (Briske-Anderson et al. 1997; Yu et al. 1997). D'autres études ont montré des variations du nombre de chromosomes dans les cellules MCF-7 (Wenger et al. 2004) ou du niveau d'expression de gènes dans les cellules MIN6 (O'Driscoll et al. 2006) en fonction du nombre de passages. De plus, des taux de croissance et une expression des protéines différents ont été démontrés sur les cellules sf9 entre un nombre de passages faible et élevé (Calles et al. 2006).

Bien que ces effets entre différents passages pourraient être très problématiques dans le domaine des études de métabolomique, puisqu'on peut facilement imaginer que le métabolome des cellules varie en fonction du passage, aucun travail étudiant ce paramètre crucial n'a à ce jour été publié à notre connaissance (Hayton et al. 2017). De fait, les passages cellulaires utilisés pour réaliser une étude métabolomique sont rarement précisés. En pratique, la production des échantillons est souvent réalisée à partir de la même ampoule de cellules sur plusieurs passages successifs. Des « batchs » sont des répliques biologiques réalisés sur différents passages cellulaires. Ainsi, l'utilisation de répliques biologiques obtenus sur différents passages cellulaires peut fortement augmenter la variabilité entre les batchs et créer un facteur de confusion compliquant l'interprétation des résultats. Dans ce travail de thèse, nous avons cherché à étudier si et comment le métabolome des cellules HepaRG était affecté en fonction du passage cellulaire.

3.2.2 Matériel et méthodes

a. Culture cellulaire

Afin d'étudier l'effet du passage sur le métabolome cellulaire des cellules HepaRG, le métabolome de ces cellules a été observé sur 7 passages cellulaires successifs (P13 à P19). Afin de comparer les différents passages entre eux, les cellules n'ont été exposées à aucune substance d'essai dans l'ensemble des expériences réalisées. Les cellules HepaRG ont été initialement données par le Dr. C. Guguen-Guillouzo qui nous a recommandé de ne les utiliser que jusqu'à P20, à cause du manque de stabilité de la lignée sur des passages plus élevés. Notre étude a été menée sur un total de n=9 échantillons pour chaque passage, avec 3 répliques techniques sur 3 batchs biologiques différents (3 lots de cellules différents) (voir figure 19). Pour chaque échantillon, 500 000 cellules HepaRG différenciées ont été déposées sur une lamelle de verre dans les puits d'une plaque 6 puits. Après 24 heures de dépôt, les cellules ont été exposées pendant 24h au milieu de traitement classiquement contenant du DMSO (0,25 %). Des échantillons « blancs », c'est-à-dire des échantillons sans cellules, ont aussi été réalisés en parallèle pour chaque expérience et pour chaque protocole, pour évaluer la contamination par le milieu extracellulaire et filtrer les variables trop bruitées dans les jeux de données.

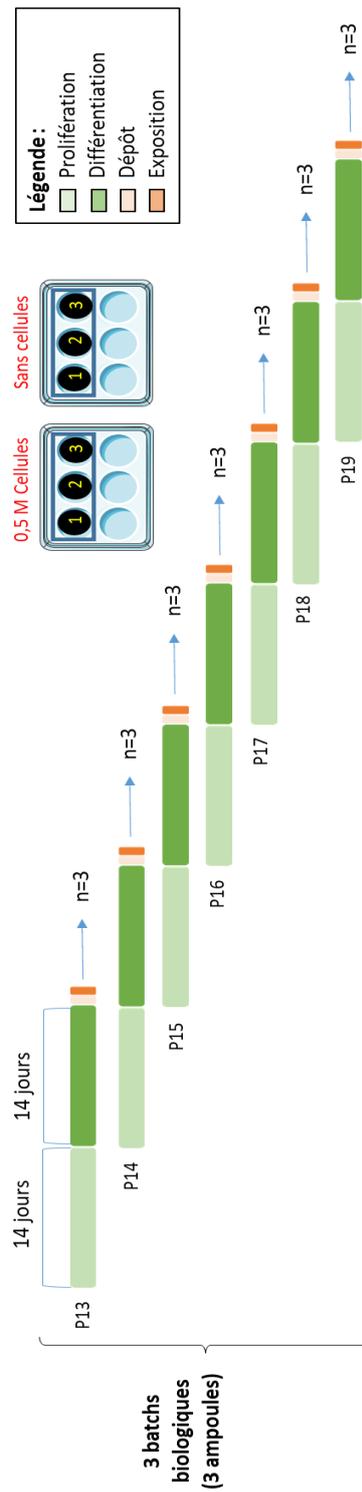


Figure 19 : Schéma du protocole expérimental mis en place pour l'étude de l'évolution du métabolome sur plusieurs passages cellulaires successifs sur le modèle HepaRG. Le métabolome a été observé sur 7 passages successifs (P13 à P19) et sur 3 ampoules différentes. Chaque ampoule a permis d'obtenir 3 répliques.

b. Méthodes analytiques

Le protocole de fast-quenching détaillé précédemment dans la partie 3.1.2.b a ensuite été appliqué afin de stopper le métabolisme des cellules et extraire les métabolites intracellulaires. Des analyses métabolomiques ciblées ont été réalisées sur les métabolites énergétiques et sur les acides aminés par spectrométrie de masse. Ces choix analytiques se justifient par le fait que certains métabolites, particulièrement les métabolites énergétiques, peuvent être très sensibles aux modifications enzymatiques et peuvent donc être facilement impactés par une baisse d'activité enzymatique pouvant se produire au fil des passages cellulaires. Des analyses métabolomiques non ciblées ont aussi été réalisées sur les mêmes spectres obtenus, en mode positif (ionisation avec une charge +) et négatif (ionisation avec une charge -).

c. Analyses statistiques

Pour les analyses ciblées, les moyennes obtenues pour chaque métabolite ont été comparées par une ANOVA à un facteur suivi d'un test post hoc de Tukey pour tester l'effet du passage cellulaire. Ce test statistique a permis une comparaison 2 à 2 de tous les passages cellulaires. Pour les analyses non ciblées, des statistiques multivariées (ACP) ont été réalisées afin d'observer la variabilité et la répartition des données sur un plus grand nombre de variables.

3.2.3 Résultats et discussion

a. Analyses métabolomiques ciblées

Le retraitement des données en métabolomique ciblée a permis d'obtenir les abondances relatives de 50 métabolites polaires. Les résultats montrent une tendance similaire pour la majorité des métabolites mesurés, avec une évolution en forme de « U » inversée au fil des différents passages cellulaires. Les passages les plus élevés (P18 et P19) semblent se distinguer des autres avec une diminution des abondances pour la majorité des

métabolites mesurés. Seules les abondances relatives mesurées pour le citrate et l'isocitrate sont augmentées sur ces deux passages cellulaires. Cet effet est significatif pour tous les métabolites mesurés. Les effets observés ont été représentés sur la figure 20 pour 6 métabolites polaires. Pour certains métabolites, des différences entre deux passages moins élevés peuvent aussi être observées. Par exemple, une différence significative a été mise en évidence entre les passages P13 et P14 pour le sédoheptulose-7-phosphate ou entre les passages P13 et P16 pour l'alanine et la glutamine. Les résultats obtenus pour l'ensemble des métabolites ciblés ont été représentés en annexe 3.

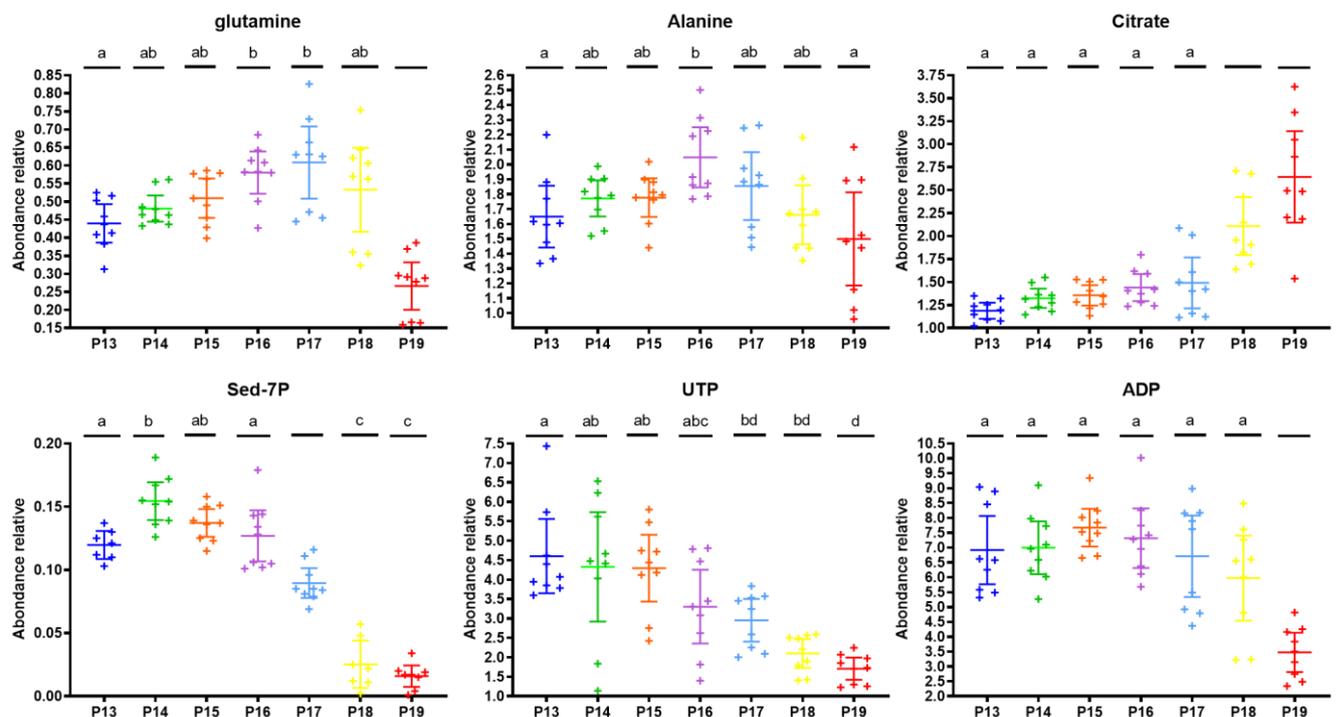


Figure 20 : Abondances relatives obtenues pour six métabolites polaires sur la lignée cellulaire HepaRG sur 7 passages successifs (n=9). Une ANOVA à un facteur suivi d'un test post hoc de Tukey a été réalisée. 2 lettres différentes indiquent des moyennes significativement différentes entre 2 passages (p -value < 0,05). Sed-7P (Sedoheptulose-7-phosphate); UTP (Uridine triphosphate); ADP (Adénosine diphosphate).

b. Analyses métabolomiques non ciblées

Les analyses non ciblées réalisées ont permis de couvrir plus largement le métabolome et ainsi observer l'évolution sur plusieurs passages avec une quantité de variables plus élevée. Le retraitement des données a permis l'observation de 443 variables en mode positif et de 1075 variables en mode négatif. Des ACP ont été réalisées sur les deux modes d'ionisations (figures 21A et 21B) afin d'observer la répartition des échantillons en fonction du passage cellulaire. Les nuages de points des ACP montrent une tendance à la séparation des échantillons en fonction du passage cellulaire qui est particulièrement prononcée sur les passages P18 et P19 dans les deux modes d'ionisation. Cette séparation pour le passage 18 et 19 semble se distinguer sur l'axe 1 de l'ACP où 8 % et 27.5 % de la variabilité sont observés selon cet axe en mode positif et négatif respectivement. Concernant les passages plus faibles (P13 à P17), une séparation peut aussi être suspectée et se distingue sur l'axe 2 de l'ACP où 4 % et 10 % de la variabilité sont observés selon cet axe en mode positif et négatif respectivement. Cependant, cet effet est beaucoup moins prononcé et une distinction entre les passages cellulaires est difficile à observer.

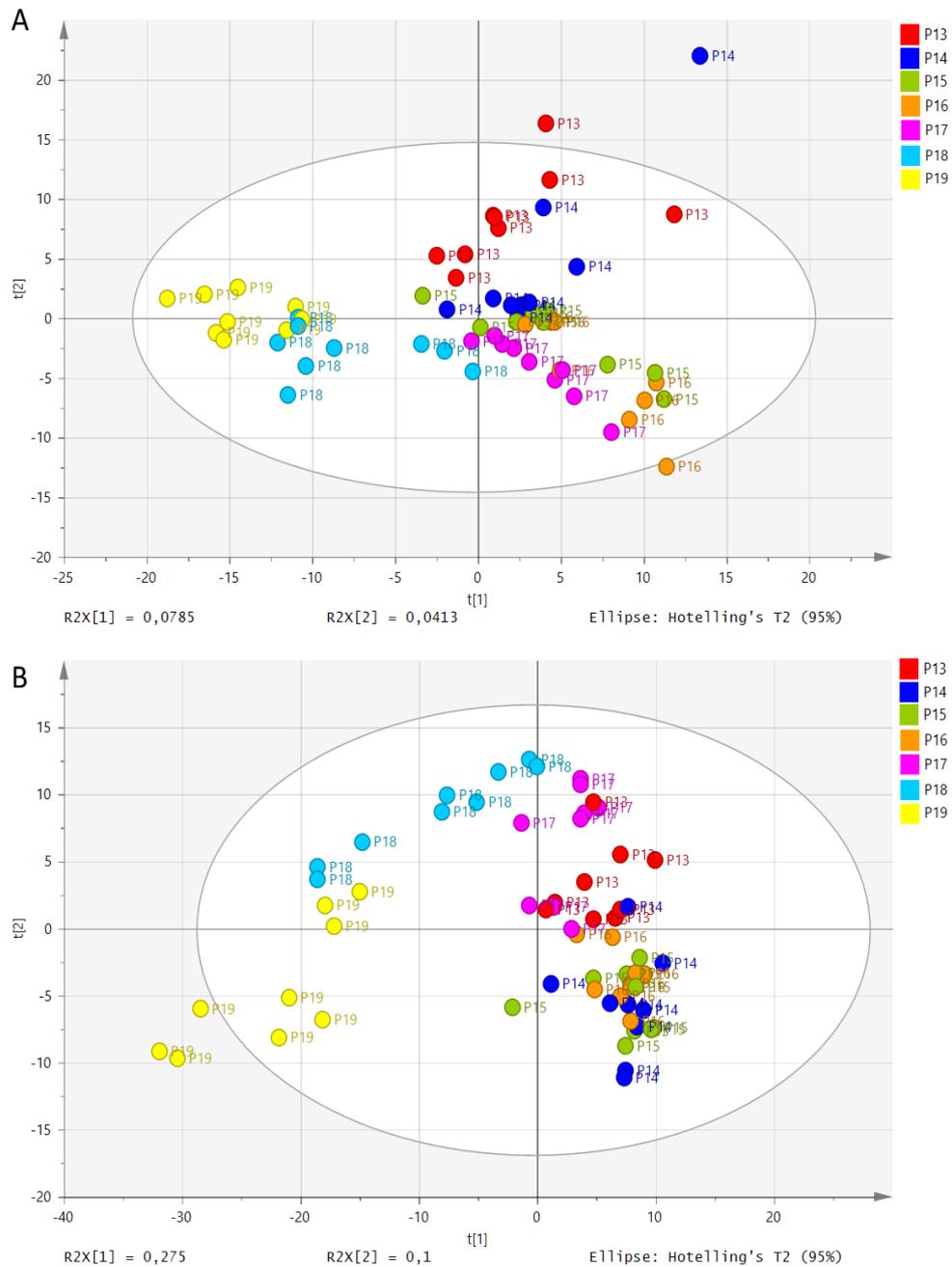


Figure 21 : Score plots des analyses en composantes principales réalisées sur les variables issues des analyses de spectrométrie de masse en mode d'ionisation positive (A) et négative (B), sur 7 passages cellulaires successifs. Une transformation logarithme et une standardisation de Pareto ont été appliquées sur les données les avant l'analyse multivariée.

Ces résultats montrent que le métabolome varie de manière significative en fonction du nombre de passages cellulaires. Comme détaillé en introduction, certaines études ont déjà mis en évidence un effet du passage cellulaire sur l'expression de gènes et l'expression de protéines. Cependant, ces effets ont été démontrés sur des modèles cellulaires avec une grande différence entre les passages (50 à 100 passages cellulaire d'écart). De plus, aucune étude métabolomique n'a été réalisée à ce jour concernant les effets entre différents passages cellulaires sur le métabolome.

Dans ce travail, il a été mis en évidence un effet du passage cellulaire sur le métabolome, pour des passages cellulaires beaucoup plus rapprochés les uns des autres sur le modèle HepaRG (7 passages successifs). Pour certains métabolites, il est possible d'observer des différences significatives entre deux passages successifs comme pour le sédoheptulose-7-phosphate (voir figure 20). Ces résultats soulignent donc l'importance de sélectionner un passage cellulaire spécifique lors d'une étude métabolomique afin de limiter l'introduction de variabilité. En effet, dans le cas où les répliques biologiques sont réalisés sur des passages cellulaires différents, une variabilité supplémentaire non liée au facteur biologique sera introduite entre les répliques, créant un facteur de confusion supplémentaire, qui peut poser problème lors d'une analyse métabolomique, en masquant partiellement l'effet biologique étudié.

Pour expliquer les effets observés, il est possible que certaines enzymes impliquées dans le métabolisme des cellules HepaRG soit affectées par les différents passages cellulaires. Dans la littérature, il a cependant été démontré des niveaux comparables d'expression des cytochromes P450 dans les cellules HepaRG différenciées sur plusieurs passages cellulaires (jusqu'au passage P20) (Anthérieu et al. 2010; Adam et al. 2020). Cependant, la métabolomique est une technologie très sensible, il est donc probable que des effets subtils au niveau de l'expression de certaines

enzymes n'aient pas été mis en évidence par des techniques classiques. Ces effets sont cependant observables en métabolomique.

Dans ce travail, la quantité de cellules de chaque réplica n'a cependant pas été estimée. Nous avons en effet considéré que la même quantité de cellules a été obtenue pour chaque réplica. Cependant, les effets observés peuvent provenir d'un effet sur la croissance cellulaire différente d'un puit à l'autre. Un dosage de protéines dans chaque échantillon aurait permis d'assurer que les effets observés proviennent uniquement d'un effet du passage cellulaire.

3.2.4 Conclusions

Lors de cette étude, il a été mis en évidence une évolution du métabolome en fonction du passage cellulaire sur le modèle HepaRG. Cet effet semble plus prononcé pour les passages cellulaires les plus élevés étudiés (P18 et P19). Ceci est en accord avec les recommandations de la société Biopredict déconseillant d'utiliser les cellules HepaRG sur des passages cellulaires supérieurs à 20 (Biopredict International). Il a aussi été possible de mettre en évidence des différences entre des passages cellulaires plus faibles (entre P13 et P17) pour certains métabolites. Toutes ces observations suggèrent que des modifications du métabolome peuvent avoir lieu entre des passages cellulaires différents et peuvent gêner à la mise en évidence d'un effet biologique. C'est pourquoi, nous avons choisi de réaliser l'ensemble des réplicas biologiques sur un seul et même passage pour les études métabolomiques réalisées sur le PFOA dans le cadre de cette thèse afin de limiter la variabilité inter-échantillons pouvant être introduite. Nous avons choisi de travailler sur le passage P16 pour les cellules HepaRG afin de pouvoir générer suffisamment de cellules pour les analyses métabolomiques. De plus, les cellules HepaRG différenciées (cellules HPR116) sont commercialisées par la société Biopredict au passage cellulaire 16. Ces cellules sont de plus en plus utilisées dans les études de toxicologie au niveau hépatique, ce qui permettra de faciliter la comparaison des résultats obtenus lors de cette thèse avec d'éventuelles études pouvant être réalisées sur HPR116.

3.3 Amélioration de la couverture du métabolome sur un même échantillon

Cette partie a fait l'objet d'un article publié dans le journal *Metabolites* au cours de cette thèse (Villaret-Cazadamont et al. 2020).

3.3.1 Introduction et problématique

En métabolomique, il est possible d'explorer les changements qui se produisent simultanément au niveau des nombreuses voies métaboliques présentes dans un organisme. Pour cela, il est essentiel de pouvoir effectuer la mesure d'un maximum de métabolites pour un échantillon biologique donné (Dunn et al. 2005). Un des défis consiste à augmenter la couverture du métabolome, ce qui, la plupart du temps, nécessite de combiner différentes préparations d'échantillons et techniques d'analyses (Vuckovic 2018). Par exemple, la récupération des lipides et des métabolites polaires implique généralement des extractions distinctes, coûteuses et longues (Wawrzyniak et al. 2018; Zhang et al. 2020). Dans les protocoles classiquement utilisés, les métabolites polaires et les lipides sont extraits indépendamment, en utilisant deux échantillons distincts : un pour la métabolomique et un pour la lipidomique (Giesbertz et al. 2015; Lebkuchen et al. 2018; Zhang et al. 2020; Yang et al. 2020). Cela double le nombre d'échantillons qui doivent être générés et analysés, ce qui est parfois difficile à mettre en œuvre lorsque le matériel biologique est limité (par exemple certains modèles cellulaires, d'autres modèles *in vitro* ou des échantillons de plasma humains ou animaux souvent disponibles en petits volumes). De plus, l'analyse des métabolites polaires et des lipides sur des échantillons biologiques distincts complique l'intégration et l'agrégation statistique des données (Acharjee et al. 2016). Pour surmonter cette limitation, de nouvelles méthodes ont été développées, dans le but de réaliser la métabolomique et la lipidomique sur un seul échantillon, en utilisant une double extraction.

La plupart des études publiées dans la littérature utilisent la métabolomique et la lipidomique non ciblées (Whiley et al. 2012; Chen et al. 2013; Godzien et al. 2013; Li et al. 2015; Nakayasu et al. 2016; Rombouts et al. 2019). Bien que les approches non ciblées permettent, en théorie, une détection large des changements métaboliques, en pratique, l'interprétation des résultats est souvent limitée par le petit nombre de métabolites identifiés avec succès. À l'inverse, certaines études choisissent d'appliquer la métabolomique et la lipidomique ciblées sur le même échantillon, ce qui permet d'étudier une gamme de molécules spécifiques en se concentrant la plupart du temps sur une classe particulière de métabolites tels que les lipides ou les acides aminés par exemple (Roberts et al. 2012; Coman et al. 2016). Bien que ces approches ciblées fournissent une couverture plus limitée du métabolome et du lipidome, elles permettent une investigation précise et sensible des changements métaboliques dans des voies biochimiques spécifiques (Serkova et al. 2011; Roberts et al. 2012).

En amont des étapes analytiques, les approches de la métabolomique et de la lipidomique nécessitent de nombreuses étapes successives, notamment la préparation des échantillons et l'extraction des cellules et des métabolites. Ces étapes génèrent souvent une grande variabilité des mesures et peuvent limiter la précision et la fiabilité de ces approches. Des standards internes marqués peuvent être utilisés pour améliorer la précision de la quantification, comme le proposent quelques études (Coman et al. 2016; Rampler et al. 2019). En effet, l'utilisation de standards isotopiques qui est basée sur l'utilisation d'étalons internes marqués au ^{13}C , corrige les erreurs causées par les variations survenant pendant l'analyse et le traitement des échantillons (Wu et al. 2005; Bennett et al. 2008), comme par exemple la variabilité inter-opérateurs dans les différentes étapes de traitement des échantillons, ou les effets de perte d'ionisation en spectrométrie de masse, qui ont un impact sur la précision analytique (Ribbenstedt et al. 2018). Une quantification précise des métabolites est nécessaire pour aller plus loin que l'identification des biomarqueurs

métaboliques et pour progresser vers l'analyse fonctionnelle de voies métaboliques spécifiques. Notamment avec une caractérisation et une compréhension précise des voies de biosynthèse et de régulation impliquant des métabolites clés tels que les acides aminés et les métabolites énergétiques (Heuillet et al. 2020). Les données quantitatives sont extrêmement utiles pour étudier un grand nombre de processus enzymatiques et leur cinétique, afin de mieux caractériser les voies biochimiques auxquelles ils contribuent (Roberts et al. 2012).

Pour maximiser la détection des métabolites dans un seul échantillon et minimiser autant que possible ces variations expérimentales indésirables, nous avons développé, en collaboration avec les plateformes TBI de métabolomique et Inserm de lipidomique, toute deux de MetaToul, une méthode qui combine la méthode d'échantillonnage de « fast-quenching » développée dans la section 3.1.2.b avec une méthode de double extraction. L'objectif était de pouvoir réaliser des analyses métabolomiques et lipidomiques sur un même échantillon, avec une quantification absolue des métabolites polaires en utilisant des standards isotopiques, et une quantification relative des lipides. Cette méthode a été appliquée sur les cellules HepaRG. Ce protocole de double extraction a été, dans un premier temps, comparé avec les protocoles classiquement utilisés pour la métabolomique et la lipidomique, afin de montrer qu'il permet d'observer une information qualitativement similaire par rapport aux méthodes classiquement utilisées. Dans un second temps, ce nouveau protocole a été appliqué pour explorer les effets métaboliques d'un composé d'intérêt afin de montrer sa capacité à observer des modulations à la fois sur les métabolites polaires et sur les lipides. Pour cela, le fénofibrate a été utilisé, un médicament connu pour son impact sur le métabolisme du foie et souvent utilisé comme composé modèle dans les études d'hépatotoxicité. L'idée étant de démontrer que cette méthode est particulièrement adaptée pour détecter avec précision des modulations couvrant différentes voies métaboliques, ce qui est approprié lorsqu'il s'agit de déchiffrer les effets

métaboliques de composés dans de nombreux domaines, particulièrement celui de la toxicologie.

3.3.2 Matériel et méthodes

a. Le protocole d'extraction classique

Dans le protocole d'extraction classique (Figure 22A), les métabolites polaires pour les analyses métabolomiques ont été extraits d'un premier échantillon en utilisant le protocole de fast-quenching détaillé précédemment (section 3.1.2.b). Les lipides ont été extraits à partir d'un second échantillon avec une solution de PBS/méthanol/dichlorométhane par une extraction biphasique en présence d'étalons internes spécifiques (chaînes d'acides gras non naturels) pour chaque famille de lipides. Deux phases ont été obtenues, la phase organique a été récupérée et concentrée afin d'analyser les lipides.

b. Le protocole de double extraction

Dans le protocole de double extraction (Figure 22B), la solution d'arrêt du métabolisme cellulaire du protocole de fast-quenching a été utilisée (Méthanol/Acétonitrile/eau acidifié, 2/2/1 v/v/v). Les métabolites polaires et les lipides ont donc été extraits du même échantillon en utilisant une extraction biphasique avec l'ajout de 2,5 mL dichlorométhane et 1 mL d'eau (Bligh and Dyer modifié). La phase aqueuse et la phase organique ont été utilisées respectivement pour les analyses métabolomiques et lipidomiques, avec les mêmes standards internes que ceux utilisés pour l'extraction classique.

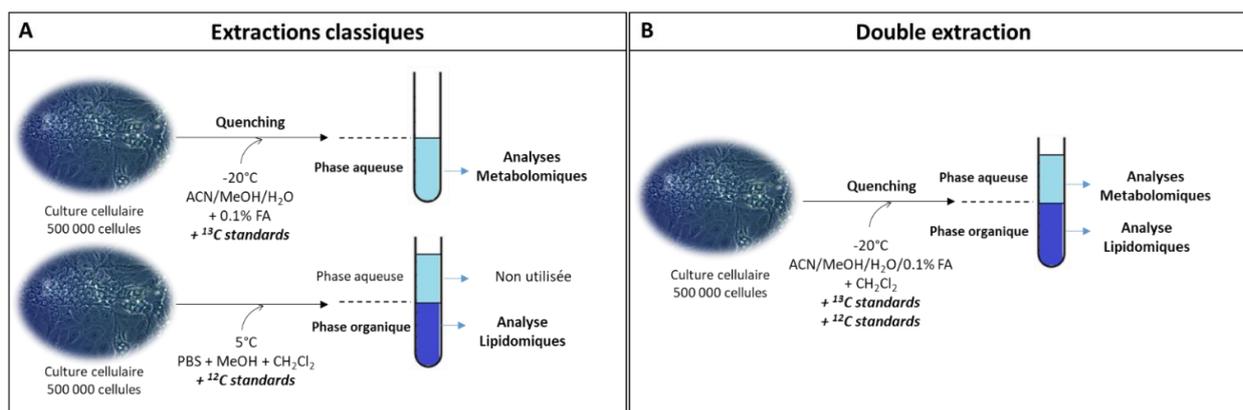


Figure 22 : Schéma expérimental des méthodes d'extractions classiques et de double extraction utilisées pour effectuer des analyses de métabolomique et de lipidomique. Pour l'extraction classique (A), un mélange d'acétonitrile (ACN), de méthanol (MeOH) et d'eau acidifiée (H₂O) avec de l'acide formique (FA) a été utilisé pour effectuer l'extraction des métabolites polaires. Une solution saline (PBS) associée à du dichlorométhane (CH₂Cl₂) et du méthanol (MeOH) a été utilisée pour extraire les lipides. Pour la méthode de double extraction (B), le mélange d'acétonitrile, de méthanol et d'eau acidifiée a été complété par du dichlorométhane et de l'eau pour extraire les métabolites polaires et les lipides sur le même échantillon. Des standards ¹³C et des étalons internes de lipides ont été ajoutés pour une quantification absolue et une quantification relative pour l'analyse métabolomique et lipidomique respectivement.

c. Analyses métabolomiques et lipidomique

La comparaison de ces deux protocoles a été réalisée avec un total de 5 échantillons pour chaque type d'extraction sur les cellules HepaRG sans appliquer de traitement (DMSO uniquement). Le protocole de double extraction a ensuite été utilisé pour étudier les effets du fénofibrate avec 18 échantillons traités et non traités au fénofibrate. Ainsi sur ces deux expériences, 4 différentes analyses ont pu être réalisées pour tous les échantillons obtenus. Pour la lipidomique, des analyses ciblées sur les phospholipides, sphingolipides et lipides neutres ont été réalisées. Pour la métabolomique, des analyses ciblées sur les acides aminés et sur les métabolites énergétiques ont été réalisées. L'ensemble des techniques analytiques et les métabolites mesurés ont été détaillés en annexe 1.

d. Analyses statistiques

Les résultats obtenus ont été exprimés en abondance relative ou en concentration (nM) pour les lipides et pour les métabolites polaires. Pour la comparaison entre les deux procédures d'extraction et entre les cellules traitées et non traitées au fénofibrate, les moyennes des abondances relatives ou des concentrations ont été comparées en utilisant le test t de Student pour chaque métabolite. De plus, un test t de Student a été effectué pour comparer les CV moyens obtenus pour les métabolites polaires et toutes les différentes classes de lipides. La distribution qualitative des espèces de lipides et des métabolites polaires au sein de chaque classe a été comparée entre les deux procédures d'extraction en utilisant le test Khi2. Les différences étaient considérées comme significatives lorsque la valeur p était inférieure à 0,05.

3.3.3 Résultats

Les deux protocoles ont été comparés pour leur efficacité à extraire certaines espèces ciblées de métabolites polaire et de lipides. La métabolomique et la lipidomique ciblées par spectrométrie de masse ont été réalisées pour 40 métabolites polaires et 82 lipides. La quantification absolue (en nM) a été obtenue pour 32 métabolites polaires. Des résultats d'abondance relative ont été obtenus pour 8 métabolites polaires et pour l'ensemble des lipides, en utilisant les rapports d'aires entre la molécule d'intérêt et leurs étalons internes.

a. Analyse quantitative et qualitative des métabolites polaires : comparaison entre les deux protocoles

Concernant les métabolites polaires, les concentrations absolues/relatives mesurées étaient similaires entre les deux protocoles. Seuls quelques métabolites polaires ont été extraits en plus petites quantités lors de l'utilisation du protocole de double extraction. Il s'agit des acides aminés phénylalanine et méthionine (Figure 23A et Figure 23B), ainsi

que de quelques métabolites liés au métabolisme énergétique : 6-phosphogluconate, α -cétoglutarate, cytidine diphosphate, guanosine diphosphate, pyridoxal-5-phosphate, uridine diphosphate acétylglucosamine et uridine 5'-monophosphate (Figure 23C et Figure 23D).

Pour ces métabolites, l'ajout de dichlorométhane et d'eau dans le protocole de double extraction, qui entraîne la formation de deux phases, peut expliquer ces différences. En effet, la polarité des métabolites est une propriété importante en ce qui concerne leur distribution lors de l'extraction liquide-liquide (Houck and Siegel 2015). Les métabolites polaires ont une plus grande affinité pour les phases aqueuses, tandis que les métabolites apolaires migrent préférentiellement vers les phases organiques (Poole and Poole 2010; Humbert et al. 2014). Les métabolites de polarité intermédiaire sont souvent répartis entre chaque phase. Par conséquent, lorsque leur concentration est évaluée dans la phase aqueuse, elle peut être sous-estimée. Cependant, ces différences sont restées très mineures entre les deux protocoles.

Néanmoins, pour les prochaines analyses, une attention particulière devra être portée sur les métabolites polaires car leur concentration absolue et leur abondance relative peuvent être sous-estimées.

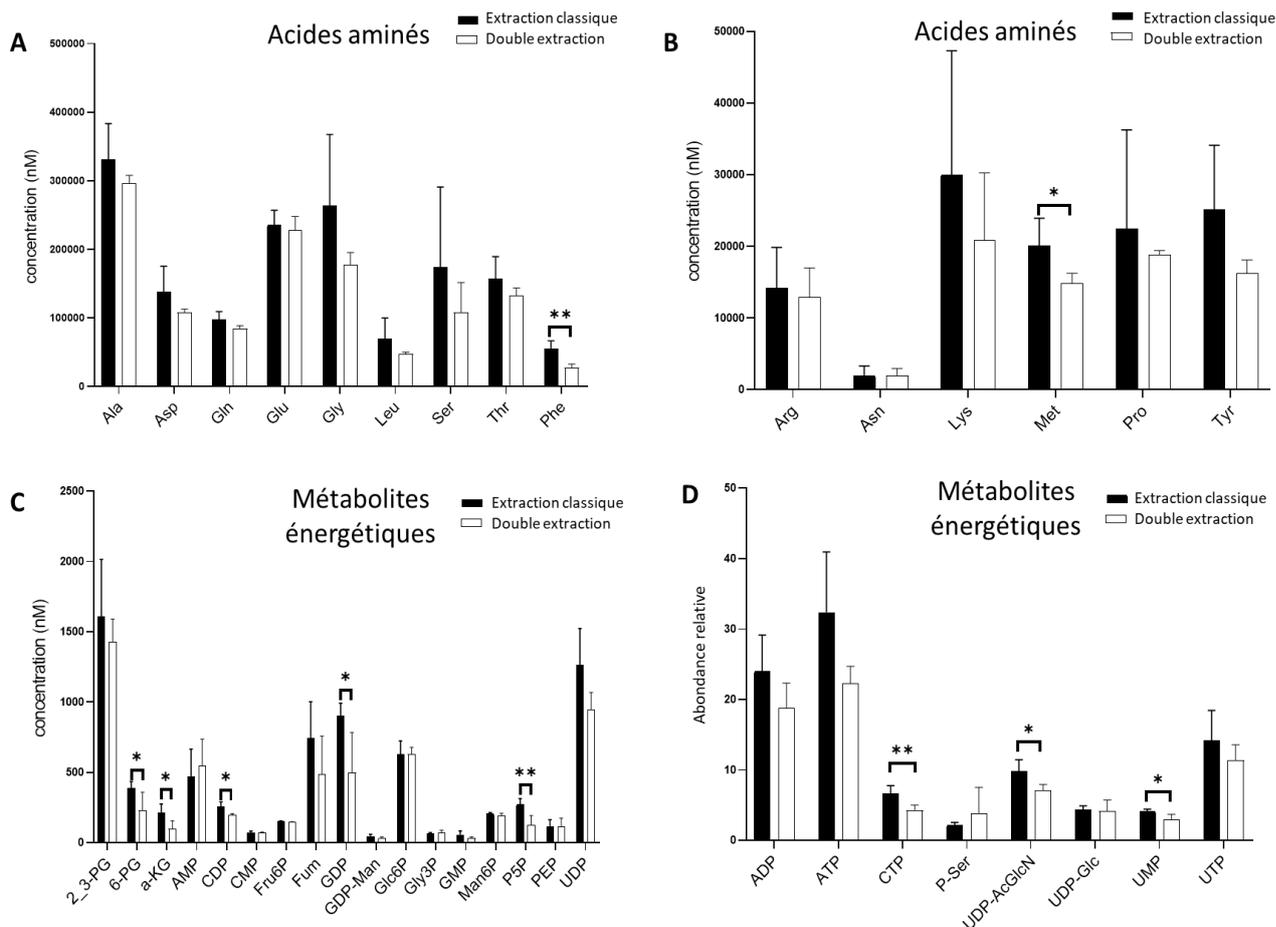


Figure 23 : Comparaison de la récupération des métabolites polaires pour les méthodes classique (barres noires) et de double extraction (barres blanches). Les acides aminés et les métabolites énergétiques ont été quantifiés en utilisant le rapport $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ pour chaque métabolite. Les concentrations ont été exprimées en nM en utilisant un étalonnage externe. L'abondance relative a été obtenue en utilisant uniquement les rapports $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$. Les barres représentent la moyenne \pm écart type ($n=5$). Des tests Student ont été effectués pour chaque métabolite (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). alanine (Ala), asparagine (Asp), glutamine (Gln), glutamate (Glu), glycine (Gly), leucine (Leu), sérine (Ser), thréonine (Thr), phénylalanine (Phe), arginine (Arg), asparagine (Asn), lysine (Lys), méthionine (Met), proline (Pro), tyrosine (Tyr), 2,3-bisphosphoglycérate (2_3PG), 6-phosphogluconate (6-PG), α -cétoglutarate (α -KG), adénosine monophosphate (AMP), cytidine diphosphate (CDP), cytidine monophosphate (CMP), fructose-6-phosphate (Fru6P), fumarate (Fum), guanosine diphosphate (GDP), guanosine diphosphate mannose (GDP-Man), glucose-6-phosphate (Glc6P), glycérol-3-Phosphate (Gly3P), guanosine monophosphate (GMP); mannose-6-phosphate (Man6P), pyridoxal-5-phosphate (P5P), phosphoénolpyruvate (PEP), uridine diphosphate (UDP), adénosine diphosphate (ADP), adénosine triphosphate (ATP), cytidine triphosphate (CTP), phosphosérine (P-Ser), uridine diphosphate acétylglucosamine (UDP-AcGlcN), uridine diphosphate glucose (UDP-Glc), uridine monophosphate (UMP), uridine triphosphate (UTP).

Pour ces raisons, la distribution qualitative de tous les métabolites polaires a été comparée pour les deux protocoles. Pour cela, le pourcentage respectif de chaque acide aminé individuel et de chaque métabolite énergétique individuel a été calculé par rapport au pool total des acides aminés et métabolites énergétiques respectivement. Cela permet de considérer leurs distributions relatives dans leurs classes respectives. Comme le montre la figure 24, aucune différence significative n'a été observée entre la distribution relative obtenue par les deux protocoles, pour les deux classes de composés. Par conséquent, la distribution relative des métabolites polaires n'a pas été influencée par le protocole d'extraction, ce qui indique que malgré des différences d'intensités observées sur certains métabolites, la répartition de ces derniers au sein de chaque classe est identique entre les deux protocoles. Un effet biologique sur un de ces métabolites pourra donc être facilement observable.

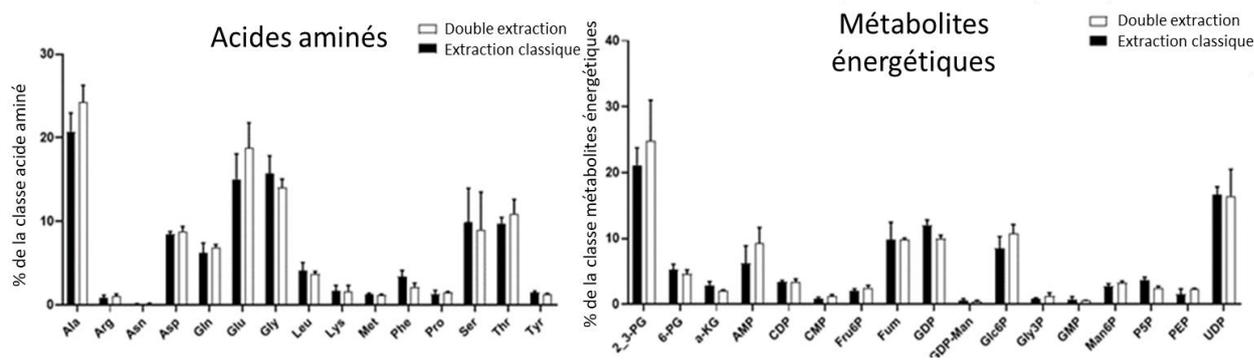


Figure 24 : Comparaison de la distribution qualitative des acides aminés (AA) et des métabolites énergétiques entre les méthodes d'extraction classique et double extraction. Les totaux de chaque classe de métabolites polaires ont été considérées comme étant de 100 %. Chaque espèce correspond au pourcentage mesuré au sein de sa classe. Les barres représentent la moyenne \pm écart type ($n=5$). Un test χ^2 a été effectué pour chaque classe afin de comparer la distribution relative entre les deux méthodes. Aucune différence significative n'a été observée.

alanine (Ala), asparagine (Asp), glutamine (Gln), glutamate (Glu), glycine (Gly), leucine (Leu), sérine (Ser), threonine (Thr), phénylalanine (Phe), arginine (Arg), asparagine (Asn), lysine (Lys), méthionine (Met), proline (Pro), tyrosine (Tyr), 2,3-bisphosphoglycérate (2_3PG), 6-phosphogluconate (6-PG), α -cétoglutarate (α -KG), adenosine 5'-monophosphate (AMP), cytidine diphosphate (CDP), cytidine 5'-monophosphate (CMP), fructose-6-phosphate (Fru6P), fumarate (Fum), guanosine diphosphate (GDP), guanosine diphosphate mannose (GDP-Man), glucose-6-phosphate (Glc6P), glycérol-3-Phosphate (Gly3P), guanosine 5'-monophosphate (GMP); mannose-6-phosphate (Man6P), pyridoxal-5-phosphate (P5P), phosphoénolpyruvate (PEP), and uridine diphosphate (UDP).

b. Analyse quantitative et qualitative des lipides : comparaison entre les deux protocoles

En ce qui concerne la récupération des lipides : les abondances relatives ont été obtenues à l'aide de standards internes pour les phospholipides (Phosphatidylcholines (PC), Phosphatidyléthanolamines (PE), Phosphatidylinositols (PI)), les sphingolipides (Céramides (CER) et Sphingomyélines (SM)), le cholestérol et les triglycérides (TG). Pour chacune de ces classes de lipides, les abondances relatives de chacune des espèces moléculaires ont été additionnées pour obtenir l'abondance relative totale de la classe (figure 25). Les résultats ont ainsi démontré que le protocole de double d'extraction permettait une meilleure extraction pour le cholestérol et les céramides où les abondances relatives sont légèrement améliorées avec le protocole de double extraction. Inversement, une extraction significativement meilleure a été observée pour la procédure d'extraction classique, pour les TG, PC, PE et PI où parfois les abondances relatives retrouvées peuvent être deux fois supérieures, comme avec les TG et PE. Les SM ont été extraits de manière similaire par les deux protocoles, aucune différence significative n'a été mise en évidence.

Bien que certaines classes de lipides se soient avérées être extraites plus efficacement en utilisant l'une des deux méthodes, la distribution relative des espèces de lipides dans chaque famille n'est pas affectée par le protocole d'extraction comme il est possible de le voir sur la figure 26. En effet comme pour les métabolites polaires, pour toutes les différentes classes de lipides, aucune différence dans la répartition qualitative des espèces n'a été mise en évidence.

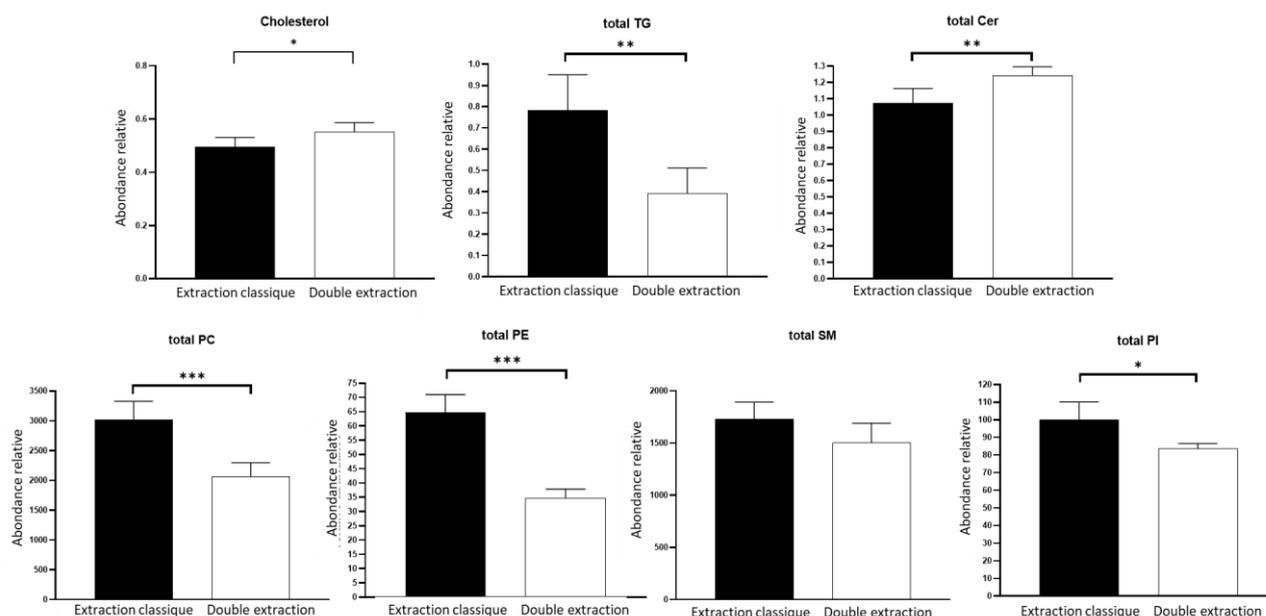


Figure 25 : Comparaison de la récupération des classes de lipides entre la méthode classique et la méthode de double extraction. Les classes de lipides correspondent à une addition de toutes les espèces (rapport d'aires avec leur étalon interne) obtenue pour chaque classe. Les barres représentent la moyenne \pm écart type ($n=5$). Des tests Student ont été effectués pour chaque métabolite (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Triglycérides (TG), céramides (Cer), phosphatidylcholines (PC), phosphatidyléthanolamines (PE), sphingomyélines (SM), phosphatidylinositols (PI).

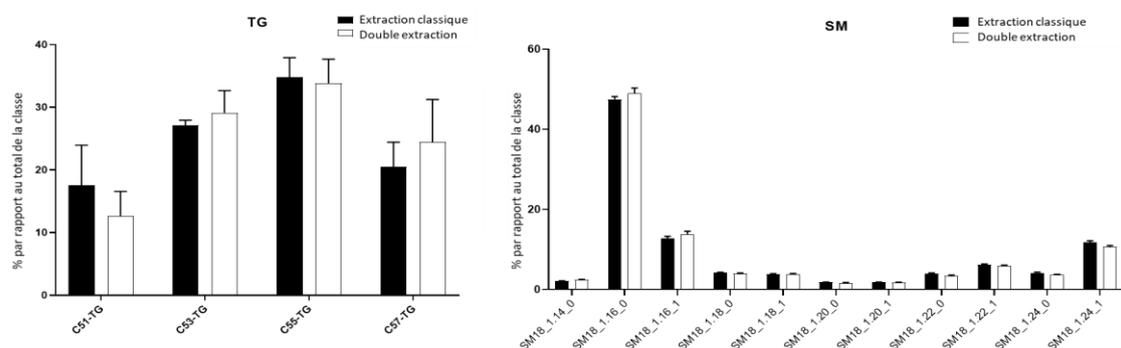


Figure 26 : Comparaison de la distribution qualitative des espèces de sphingomyéline (SM) et de triglycérides (TG) entre la méthode classique et la méthode de double extraction. Chaque espèce est représentée en proportion (%) de sa classe totale. Chaque classe de lipides étant considérées comme étant de 100 %. Les barres représentent la moyenne \pm SD ($n=5$). Un test Khi2 (χ^2) a été réalisé séparément pour chaque classe afin de comparer la distribution relative entre les deux méthodes. Aucune différence significative n'a été observée

c. Comparaison dans la reproductibilité des deux protocoles

Pour évaluer la reproductibilité des deux méthodes, les coefficients de variation (CV) ont été calculés pour tous les métabolites polaires et lipides, individuellement pour chaque méthode d'extraction. Les résultats ont montré une reproductibilité significativement améliorée pour la méthode de double extraction, par rapport au protocole classique, pour les acides aminés ($CV_{\text{Double extraction}} = 17,38 \pm 17,04 \%$; $CV_{\text{extraction classique}} = 36,10 \pm 20,68 \%$), CER ($CV_{\text{Double extraction}} = 6,35 \pm 1,80 \%$; $CV_{\text{extraction classique}} = 9,51 \pm 1,71 \%$) et PI ($CV_{\text{Double extraction}} = 4,73 \pm 1,88 \%$; $CV_{\text{extraction classique}} = 10,95 \pm 1,42 \%$). Inversement, la variabilité est légèrement plus élevée avec la méthode de double extraction pour les SM ($CV_{\text{Double extraction}} = 13,11 \pm 2,47 \%$; $CV_{\text{extraction classique}} = 9,99 \pm 3,05 \%$), mais ces valeurs restent néanmoins acceptables (inférieure à 20%). Aucune différence significative n'a été observée pour les métabolites énergétiques, TG, PC et PE, respectivement.

Il est possible que l'utilisation de l'acétonitrile dans le protocole de double extraction puisse minimiser la dégradation de certains métabolites polaires ainsi que des lipides (Rabinowitz and Kimball 2007), ce qui peut expliquer l'amélioration de certains CV pour la méthode de double extraction et les différences dans la récupération des classes de lipides.

Tous les résultats obtenus ont donc montré que tous les métabolites et lipides polaires ciblés pouvaient être efficacement détectés en utilisant les deux procédures d'extraction, et donc que le protocole de double extraction était capable de détecter et de quantifier tous les acides aminés, métabolites énergétiques et lipides mesurés classiquement. Bien que quelques espèces de métabolites polaires et de lipides se soient avérées mieux extraites avec le protocole d'extraction classique, sur des bases quantitatives, la distribution relative des espèces de métabolites et de lipides polaires au sein de chaque famille s'est avérée identique.

d. Exploration des effets métaboliques du fénofibrate en utilisant le protocole de double extraction

Par la suite, le protocole de double extraction a été utilisé pour étudier l'effet du fénofibrate sur le métabolisme du foie. Les cellules HepaRG (n=18) ont été exposées à une forte concentration (450 μ M) de fénofibrate solubilisé dans du DMSO (0,25%). Le fénofibrate est un ligand de PPAR α et est cliniquement utilisé comme agent hypolipidémiant (Ma et al. 2020). De nombreuses études ont été publiées, notamment sur les effets du fénofibrate sur le métabolisme des lipides chez les rongeurs (Soria et al. 2002; Lu et al. 2011). Cependant, des différences entre les espèces ont été démontrées en réponse aux agonistes de PPAR α , notamment entre l'Homme et les rongeurs (Yang et al. 2008). Chez l'Homme, la plupart des études ont exploré les effets du fénofibrate dans le plasma (Croyal et al. 2018), mais seules quelques études réalisées *in vitro* se sont focalisées sur les effets du fénofibrate sur le foie chez l'Homme. Bien que le fénofibrate soit soupçonné d'affecter différentes voies métaboliques, la plupart des études se sont concentrées sur ses effets sur le métabolisme des lipides. Nous avons utilisé la nouvelle méthode de double extraction pour explorer les effets métaboliques plus larges du fénofibrate dans le foie humain, en utilisant la lignée cellulaire HepaRG. Les résultats obtenus ont montré que 46 métabolites polaires et lipides étaient affectés par le fénofibrate (figure 27).

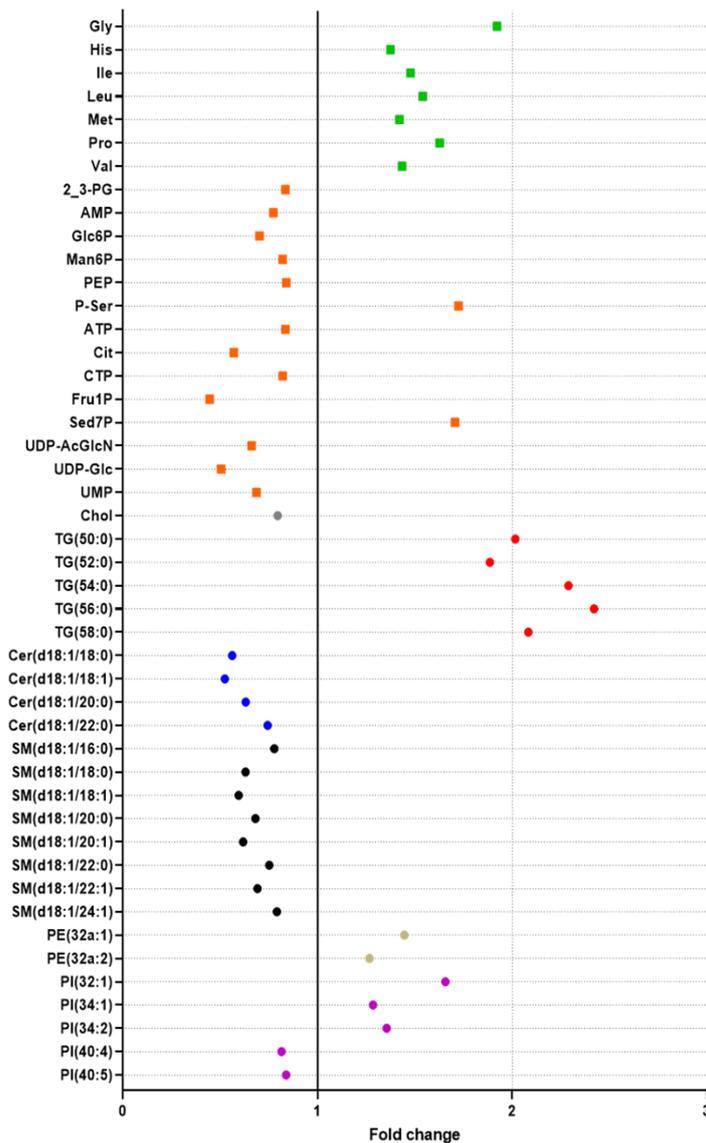


Figure 27 : Effet d'une forte concentration de fénofibrate (450 µM) sur les cellules HepaRG. Les données ont été obtenues avec 18 répliques. Des tests t ont été effectués pour chaque métabolite afin de comparer les cellules non traitées (DMSO) et les cellules traitées (fénofibrate). Tous les métabolites polaires significatifs (■) et les lipides (●) ont été représentés dans cette figure avec des fold change (rapport de moyenne). Différentes couleurs ont été utilisées pour représenter les acides aminés (vert), les métabolites énergétiques (orange), le cholestérol (gris), les TG (rouge), les CER (bleu), les SM (noir), le PE (marron) et le PI (violet). Les fold change ont été obtenus pour chaque métabolite et lipide en divisant les moyennes obtenues pour le traitement au fénofibrate par les moyennes obtenues pour l'exposition au DMSO. L'augmentation des métabolites dans la condition fénofibrate est indiquée sur la droite (fold change > 1) et la diminution des métabolites dans la condition fénofibrate est indiquée sur la gauche (fold change < 1). glycine (Gly), phosphosérine (P-Ser), sédoheptulose-7-phosphate (Sed7P), proline (Pro), leucine (Leu), isoleucine (Ile), valine (Val), méthionine (Met), histidine (His), phosphoénolpyruvate (PEP), adénosine triphosphate (ATP), 2,3-bisphosphoglycerate (2_3PG), cytidine triphosphate (CTP), mannose-6-phosphate (Man6P), cholestérol (Chol), adenosine monophosphate (AMP), glucose-6-phosphate (Glc6P), uridine monophosphate (UMP), uridine diphosphate acétylglucosamine (UDP-AcGlcN), citrate (Cit), uridine diphosphate glucose (UDP-Glc), fructose-1-phosphate (Fru1P), triglycérides (TG), céramides (Cer), phosphatidyléthanolamine (PE), sphingomyélines (SM), phosphatidylinositols (PI)

En ce qui concerne les lipides, la majorité des Cer et des SM ont été significativement diminués par une exposition au fénofibrate. Inversement, toutes les espèces de TG mesurées ont été significativement augmentées par le fénofibrate. Certains PI et PE ont aussi été altérés par le fénofibrate avec une diminution ou une augmentation de leur concentration selon les espèces. Aucune différence significative n'a été observée pour les PC.

Des études ont également démontré une accumulation de TG dans le foie de rongeurs et de cellules HepG2 (hépatocytes humains) exposées au fénofibrate (Soria et al. 2002; Yan et al. 2014). Cependant, les effets du fénofibrate sur les TG hépatiques restent controversés, d'autres études réalisées sur les cellules HepaRG et les rongeurs montrent que le fénofibrate réduit l'accumulation de TG dans le foie (Tsoko et al. 1998; Harano et al. 2006; Rogue et al. 2014), ou n'affecte pas la teneur en TG hépatiques (Franco et al. 2020). Ces différents résultats peuvent s'expliquer par l'utilisation de différents modèles cellulaires. En ce qui concerne les Cer et les SM, aucune étude n'a pour le moment démontré une diminution de ces composés dans les cellules hépatiques suite à une exposition au fénofibrate. Il a déjà été montré que la teneur en SM et en Cer des cellules hépatiques exposées au fénofibrate n'était pas affectée par l'exposition, mais seulement à de faibles concentrations (Franco et al. 2020). Inversement, une étude *in vivo* a rapporté une diminution de ces deux composés dans le plasma humain (Croyal et al. 2018). Les auteurs ont observé une corrélation entre ces deux familles suggérant que les Cer et les SM pourraient être affectés de la même manière par le traitement au fénofibrate, ce qui est en accord avec les résultats de cette étude.

En ce qui concerne les métabolites polaires, la concentration de certains acides aminés, principalement les acides aminés aliphatiques (glycine, proline, leucine, isoleucine, valine), mais aussi la méthionine et l'histidine, a été significativement affectée par une exposition au fénofibrate. Tous ces

acides aminés présentent des concentrations plus élevées dans les cellules exposées au fénofibrate par rapport aux témoins.

Le fénofibrate affecterait également les niveaux d'acides aminés dans le plasma des souris, notamment la glycine, l'isoleucine, la leucine, la valine mais aussi le glutamate, la phénylalanine, la sérine, le tryptophane et la tyrosine (Lu et al. 2011). Bien que ces résultats ne soient pas directement comparables aux nôtres, car les matrices (contenu intra- ou extra-hépatique) sont différentes, ils suggèrent fortement que le fénofibrate a un impact sur le métabolisme hépatique des acides aminés.

De nombreux métabolites énergétiques sont également affectés par le fénofibrate, notamment les métabolites de la voie de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphates (glucose 6 Phosphate, fructose 1 Phosphate, phosphoénolpyruvate et sédoheptulose 7 Phosphate) et le cycle de Krebs (citrate). Tous ces métabolites ont des concentrations réduites dans les cellules exposées, à l'exception du phosphosérine et du sédoheptulose 7 Phosphate dont les concentrations sont augmentées de manière significative dans les cellules exposées.

Les observations suggèrent que le Glucose 6 Phosphate et le sédoheptulose 7 Phosphate, appartenant tous les deux à la voie des pentoses phosphates, ont été respectivement diminués et augmentés par le fénofibrate. Ces observations sont en accord avec les résultats rapportés par Oosterveer *et al.* (Oosterveer et al. 2009), qui ont montré que la teneur hépatique en Glucose 6 Phosphate était réduite dans le foie des souris traitées au fénofibrate. Ces auteurs ont conclu que la voie du pentose phosphate était vraisemblablement affectée par le fénofibrate.

Dans la présente étude, nous avons également observé une diminution du citrate et du phosphoénolpyruvate, deux métabolites appartenant respectivement au cycle de Krebs et à la dernière étape de la glycolyse. En outre, l'ATP qui est produit par le cycle de Krebs et la glycolyse, a également été réduit. Des observations similaires ont été rapportées par Ohta *et al.* (Ohta et al. 2009), avec une réduction des

intermédiaires du cycle de Krebs suggérant que l'homéostasie du métabolisme énergétique pourrait être altérée.

Il faut noter que la concentration en fénofibrate utilisée dans cette étude (450 μM) est plus élevée que les concentrations thérapeutiques utilisées chez l'Homme. Dans des conditions thérapeutiques pour l'Homme, une dose quotidienne de 145 mg de fénofibrate donne une concentration plasmatique maximale de 11,016 mg/L (Chachad et al. 2014), ce qui représente environ 30 μM dans le sang. Par conséquent, cette étude ne permet pas de conclure directement sur l'effet du fénofibrate à des doses thérapeutiques mais pourrait aider à comprendre l'effet de cette molécule dans le foie à des concentrations plus élevées et éventuellement toxiques. Dans cette étude, le fénofibrate a été utilisé comme molécule modèle pour la toxicité du foie. Grâce à cette nouvelle procédure d'extraction, le profil quantitatif et qualitatif des métabolites polaires et apolaires peut être établi simultanément, une modulation majeure du métabolome hépatique dans les cellules HepaRG a ainsi été mise en évidence. L'impact du fénofibrate a été confirmé sur le métabolisme des lipides hépatiques dans les cellules humaines, mais des effets plus larges sur le métabolisme hépatique ont aussi été mis en évidence, en modulant de nombreux métabolites polaires impliqués dans différentes voies métaboliques.

3.3.4 Conclusions

Dans cette partie de l'étude, il a été montré que le protocole de double extraction réalisé sur un seul échantillon peut fournir un excellent profilage des métabolites polaires et apolaires, avec des résultats similaires à ceux d'une extraction classique réalisée sur deux échantillons différents. Ce nouveau protocole a été validé sur les cellules HepaRG et a permis d'obtenir un profil quantitatif et qualitatif très satisfaisant. Lors d'une application de ce nouveau protocole au fénofibrate, il a été observé que de nombreux métabolites étaient affectés par l'exposition, démontrant ainsi la capacité

du protocole à mettre en évidence simultanément une modulation des métabolites polaires et des lipides. En métabolomique, la préparation des échantillons est toujours un point critique. À cet égard, le protocole de double extraction offre de nombreux avantages en termes de temps d'expérimentation et d'analyse, réduit les coûts totaux et peut facilement être appliqué à de nombreux modèles différents, en particulier lorsque la quantité d'échantillons biologiques est limitée. Il sera donc très utile pour divers projets utilisant la métabolomique et la lipidomique pour explorer les modulations métaboliques, telles que celles soupçonnées pour de nombreux contaminants alimentaires ou environnementaux. Dans le cadre de cette thèse, ce protocole de double extraction a donc été utilisé pour étudier les effets du PFOA.

4. Exploration des effets métaboliques du PFOA

Comme détaillé précédemment en introduction dans la partie 1.3.4.b le PFOA semble induire de multiples effets au niveau hépatique. Quelques études ont notamment démontré une perturbation des voies lipidiques, des acides aminés et des voies énergétiques dans le foie (Yu et al. 2016; Franco et al. 2020; Louisse et al. 2020). Cependant une majorité de ces études a été réalisée avec une exposition à de fortes doses qui ne sont pas représentatives de l'exposition humaine à ce composé. De plus, beaucoup d'études ont été réalisées chez les rongeurs, ce qui peut poser des problèmes d'interprétation des résultats au vue des différences inter-espèces. Ainsi dans cette partie, nous avons fait le choix d'utiliser trois concentrations différentes pour étudier les effets du PFOA sur le modèle hépatique humaine HepaRG. Les concentrations ont été sélectionnées en accord avec la littérature sur les niveaux d'imprégnation du PFOA chez l'Homme. Nous avons retenu les concentrations de 10, 0,1 et 0,001 μM , englobant des niveaux d'exposition estimés pour des personnes travaillant dans des industries utilisant du PFOA et donc quotidiennement exposés au PFOA, des personnes résidant autour de ces industries, et la population générale. Le modèle HepaRG a été utilisé afin de mieux caractériser les effets de ce composé sur le foie chez l'Homme. De plus, 2 durées d'exposition ont été testées : une exposition courte (1 jour), représentant une exposition ponctuelle, et une exposition longue (28 jours) davantage représentative d'une exposition chronique, et qui reflète la situation plus générale.

Dans un premier temps, une première évaluation de l'effet du PFOA au niveau hépatique à ces 3 concentrations et pour ces 2 durées d'exposition a été réalisée par l'utilisation de tests phénotypiques ciblés. L'objectif était d'avoir une idée des points d'action du PFOA sur les cellules HepaRG aux concentrations et aux temps d'exposition sélectionnés.

Pour cela, nous avons opté pour 3 tests que nous avons jugé pertinents de réaliser en première approche :

- La viabilité des cellules HepaRG a été évaluée face à une large gamme de concentrations en PFOA, ce qui a permis d'évaluer l'effet du PFOA sur la viabilité cellulaire sur ce modèle hépatique.
- Les activités des transaminases et des transpeptidases, marqueurs d'une souffrance hépatique, ont été mesurées dans le but de mettre en évidence un potentiel effet toxique du PFOA à ces concentrations et aux temps d'exposition sélectionnés pour le modèle HepaRG.
- L'accumulation des lipides intracellulaires a été évaluée suite à l'exposition des cellules HepaRG aux PFOA. Les lipides sont en effet fortement suspectés d'être affectés par le PFOA au niveau hépatique.

Dans un second temps, la métabolisation du PFOA a été étudiée afin de déterminer tout d'abord l'ensemble des métabolites formés via les voies de biotransformation hépatique et qui peuvent être aussi potentiellement toxiques. Dans le même temps, la pénétration du PFOA dans les cellules HepaRG a été évaluée afin de déterminer quelle quantité de PFOA entre réellement dans les cellules HepaRG et à quel temps le PFOA est le plus susceptible de pénétrer dans les cellules et d'atteindre ses cibles biologiques.

L'ensemble de ces approches sont complémentaires aux analyses métabolomiques réalisées qui visent à caractériser plus finement les effets du PFOA sur le métabolisme hépatique chez l'Homme.

4.1 Etude de l'effet du PFOA sur la viabilité cellulaire

4.1.1 Objectif et principe général du test

Dans cette partie, le modèle HepaRG a été exposé à une large gamme de concentrations de PFOA avec l'objectif d'estimer le seuil de cytotoxicité de ce composé sur ce modèle d'étude. Chaque modèle cellulaire possède un seuil de cytotoxicité différent face au PFOA. Le temps d'exposition joue aussi un rôle important. De nombreuses études ont estimé la cytotoxicité du PFOA sur d'autres modèles *in vitro* hépatiques, fréquemment utilisés. Une cytotoxicité débutant à 200 μM a été estimée sur le modèle HepG2 pour 24 heures d'exposition (Florentin et al. 2011) et à partir de 400 μM pour le modèle HL-7702 pour 96 heures d'exposition (Zhang et al. 2016). Ce seuil de cytotoxicité a été observée vers 750 μM sur le modèle HepaRG après 48 heures d'exposition (Behr et al. 2020). Aucune étude *in vitro* n'a estimé jusqu'ici la viabilité cellulaire après une longue période d'exposition au PFOA. Contrairement à de nombreux modèles *in vitro*, il est possible de réaliser des expositions à long terme sur le modèle HepaRG. Nous avons cherché à déterminer la toxicité du PFOA après une exposition longue et répétée (28 jours), sur notre modèle d'étude.

Il existe de nombreuses méthodes pour mesurer la cytotoxicité d'un composé sur une lignée cellulaire (Sonnaert et al. 2015). Parmi ces méthodes, le test PrestoBlue est une méthode fluorimétrique très sensible permettant d'évaluer la viabilité des cellules au sein d'un échantillon. Elle utilise la résazurine, qui est une molécule non fluorescente qui peut être réduite par les cellules viables en résorufine fluorescente dans des longueurs d'onde proches de l'infrarouge. Ainsi, l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité de résorufine produite par les cellules, ce qui reflète la quantité de cellules viables dans une condition donnée.

4.1.2 Matériel et méthodes

Lors de cette étude, 50 000 cellules HepaRG différenciées par puits ont été déposées dans les puits d'une plaque 96 puits, avec pour chacun 200 µL de milieu de culture. Après 24 heures de dépôt au fond des puits, 100 µL de milieu de traitement contenant 5 % de SVF avec différentes concentrations en PFOA ont été mis en contact avec les cellules. Les cellules ont été exposées pendant 28 jours à une large gamme de concentrations en PFOA allant de 1 à 1000 µM (n=8) avec un changement de milieu de culture tous les deux jours. Des conditions témoins sans exposition (DMSO 0,25 %) et induisant une mortalité cellulaire (Triton 0.1%) ont été utilisées. La toxicité cellulaire du PFOA sur les cellules HepaRG a ensuite été évaluée à l'aide du PrestoBlue. Pour cela, après un lavage de chaque puits au PBS, 100 µL de PrestoBlue dilué au 1/10^{ème} dans du milieu de culture a été introduit dans chaque puits à la fin de l'exposition au PFOA. Les cellules ont été à nouveau incubées à 37°C pendant 2 heures en présence du PrestoBlue. Une mesure de la fluorescence de chaque puit a été effectuée après ces 2 heures d'incubation sur un TECAN (Infinite 200 PRO series) avec une longueur d'onde d'excitation de 535 nm et d'émission de 615 nm.

4.1.3 Résultats et discussion

La figure 28 montre le pourcentage de viabilité cellulaire obtenu après exposition des cellules HepaRG à différentes concentrations en PFOA pendant 28 jours. Les valeurs obtenues pour chaque concentration correspondent au pourcentage de viabilité des cellules par rapport au contrôle négatif, qui a été fixé arbitrairement à 100%. Ainsi, une diminution significative de la viabilité cellulaire à 70 % a été observée à partir de 50 µM et à moins de 40 % pour une exposition de 100 µM en PFOA. La cytotoxicité semble très importante à partir de 200 µM où le pourcentage de viabilité cellulaire est inférieur à 20%. L'ensemble des concentrations supérieures à 50µM a été significativement impacté par rapport au témoin négatif. Ainsi, le PFOA entraîne une cytotoxicité (mort cellulaire)

uniquement pour de fortes concentrations d'exposition après 28 jours d'exposition. Il est important de noter que la baisse de la viabilité cellulaire intervient sur des concentrations largement inférieures pour une exposition longue, comparé aux données disponibles dans la littérature pour des temps d'exposition courts. Ce test nous permet de conclure qu'aux concentrations d'exposition sélectionnées pour l'étude du PFOA (10 μ M, 0,1 μ M et 0,001 μ M), il n'y a pas de mort cellulaire.

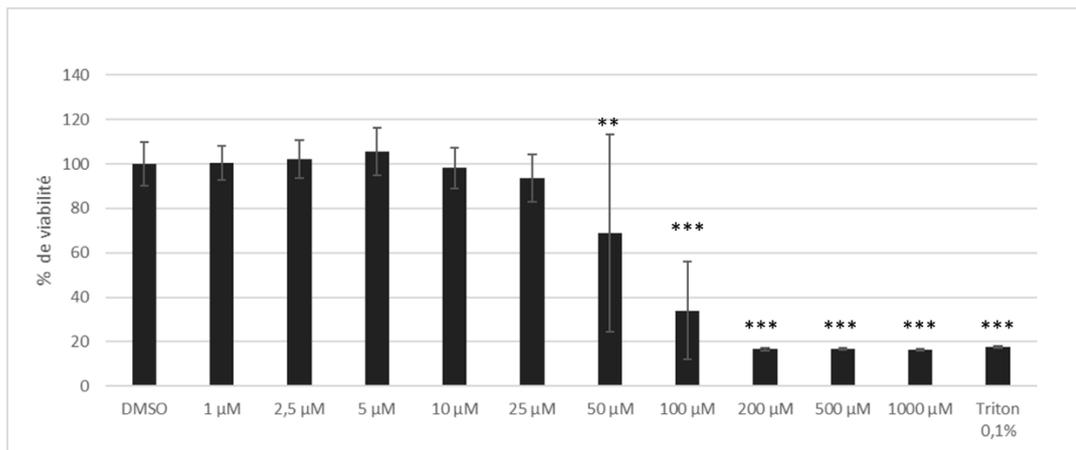


Figure 28 : Mesure de la viabilité cellulaire des cellules HepaRG après 28 jours d'exposition à une gamme de concentration en PFOA. (n=8)

4.2 Etude des effets du PFOA sur les activités des transaminases et transpeptidases

4.2.1 Objectif et principe général du test

Les transaminases et transpeptidases telles que l'aspartate aminotransférase (ASAT), l'alanine aminotransférase (ALAT) et la Gamma-glutamyltranspeptidase (GGT) sont des enzymes présentes dans différents tissus chez l'Homme, particulièrement au niveau du foie. Leur rôle respectifs est de permettre le transfert de groupements aminés et l'hydrolyse de liaisons peptidiques lors de processus biochimiques liés au métabolisme hépatique (McGill 2016). En bref, la GGT est une enzyme qui catalyse le transfert d'acides glutamiques vers des molécules telles que des acides aminés ou des peptides. La GGT joue aussi un rôle clé dans le cycle du glutamate, une voie critique pour l'homéostasie du glutathion ainsi que pour la détoxification des xénobiotiques. L'ALAT est une enzyme qui catalyse le transfert réversible du groupe amine de l'alanine à l'alpha-cétoglutarate, générant du pyruvate et du glutamate. Les lésions hépatocellulaires entraînent souvent une augmentation des taux sériques d'ALAT et ces taux peuvent être utilisés comme marqueurs des lésions hépatiques. L'ASAT est une enzyme qui catalyse la conversion de l'aspartate et du cétoglutarate en oxaloacétate et glutamate. Tout comme l'ALAT, le taux d'ASAT dans le sang est couramment utilisé comme marqueurs de la souffrance hépatique. Cependant, l'ASAT a une distribution tissulaire plus large que l'ALAT et des perturbations des niveaux d'ASAT peuvent se produire en réponse à des maladies ou de l'atteinte de multiples tissus. Les taux sériques de ces enzymes peuvent être élevés dans de nombreux états physiopathologiques tels que les maladies cardiovasculaires, les maladies chroniques du foie et le syndrome métabolique. La concentration de ces enzymes est fréquemment contrôlée chez l'Homme pour évaluer la souffrance hépatique. Des taux sériques élevés peuvent également indiquer un stress oxydatif.

Dans notre étude, le dosage de ces enzymes a été réalisé dans les milieux extracellulaires des cellules HepaRG à la suite d'une exposition à différentes concentrations en PFOA (10 ; 0,1 et 0,001 μM). L'objectif était de rechercher *in vitro* une cytolysse des cellules hépatiques et de déterminer la concentration et le temps d'exposition pour lequel une souffrance hépatique était observée.

4.2.2 Matériel et méthodes

Les cellules HepaRG ont été exposées aux 3 concentrations plasmatiques sélectionnées (10 ; 0,1 et 0,001 μM) pour des périodes de 1 et 28 jours d'exposition. Pour 28 jours d'exposition, les cellules ont été exposées de manière répétée au PFOA par un changement de milieu de culture tous les deux jours. Les milieux extracellulaires ont été récupérés à la suite des dernières 24 heures d'exposition pour ces deux temps d'exposition (n=3).

Les mesures de l'activité des enzymes ALAT, ASAT et GGT ont été réalisées dans les milieux avec des kits de dosage de ces enzymes (Sigma Aldrich). Pour cela, un faible volume (ALAT \rightarrow 20 μL , ASAT \rightarrow 20 μL , GGT \rightarrow 10 μL) de chaque échantillon a été mis en contact avec un réactif spécifique pour le dosage de chaque enzyme. Ce réactif, qui a été dilué dans une solution Tampon (100 μL par puits), permet alors de stimuler l'enzyme ciblée de l'échantillon afin de générer un produit coloré ou fluorescent. L'intensité de l'absorbance ou de la fluorescence obtenue étant représentative de la concentration de ces enzymes dans l'échantillon. Une cinétique par mesure de l'absorbance ou de la fluorescence a été réalisée toutes les 5 minutes afin de déterminer l'activité de ces enzymes dans les échantillons. Une gamme étalon construite avec des solutions standard a aussi été réalisée pour quantifier cette activité enzymatique. Ainsi, la mesure de la fluorescence ou de l'absorbance de chaque puit a été obtenue sur un TECAN Infinite 200 avec une longueur d'onde spécifique à chaque composé mesuré (ALAT : longueur d'onde excitation \rightarrow 535 nm, longueur d'onde émission \rightarrow 587 nm ; ASAT : Absorbance \rightarrow 450 nm, GGT : Absorbance \rightarrow 418 nm).

4.2.3 Résultats et discussion

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 29 où les moyennes obtenues pour les différentes concentrations ont été comparées par une ANOVA. Aucune différence significative n'a été observée pour le dosage de l'activité de l'ALAT et de l'ASAT après 1 et 28 jours d'exposition. De plus, aucune activité GGT n'a été détectée dans les milieux extracellulaires des cellules HepaRG à 1 jour ou 28 jours d'exposition.

Certaines études chez les rongeurs ont montré une augmentation de la concentration de l'ALAT et l'ASAT 5 mg/kg/jours de PFOA pendant 3 semaines (Tan et al. 2013). Cependant, les animaux ont été exposés à de fortes concentrations en PFOA, peu représentatives de l'exposition humaine. Des études chez l'Homme dans le plasma ont aussi démontré une augmentation des taux de ces enzymes en lien avec une hausse de la concentration plasmatique en PFOA (Costa et al. 2009; Lin et al. 2010; Yamaguchi et al. 2013; Gleason et al. 2015). Ceci a été observé à la fois chez les travailleurs exposés à de fortes concentrations en PFOA, mais aussi dans la population générale faiblement exposée à ce composé. Cependant, pour ces études, les échantillons de plasma humain ont été obtenus chez des individus exposés au PFOA pendant plusieurs dizaines d'années. Le PFOA étant un contaminant alimentaire bioaccumulable avec un temps de demi-vie d'élimination très élevée chez l'Homme (temps au bout duquel la moitié de sa concentration sanguine dans l'organisme diminue de moitié), il est difficile de reproduire ce type d'exposition dans le cadre d'une étude *in vitro*. Ceci peut expliquer le fait qu'aucun effet significatif n'ait été mis en évidence dans notre étude. De plus, une augmentation des taux de ces enzymes n'est pas spécifique d'une souffrance hépatique (*in vivo*, il peut aussi mettre en évidence des problèmes au niveau musculaire, cardiaque ou rénal). Par ailleurs, lors de cette étude, les résultats ont été obtenus sur seulement 3 échantillons. Or, une variabilité importante a été observée entre les différents échantillons, c'est pourquoi les résultats obtenus doivent être confirmés sur un nombre de répliques plus important.

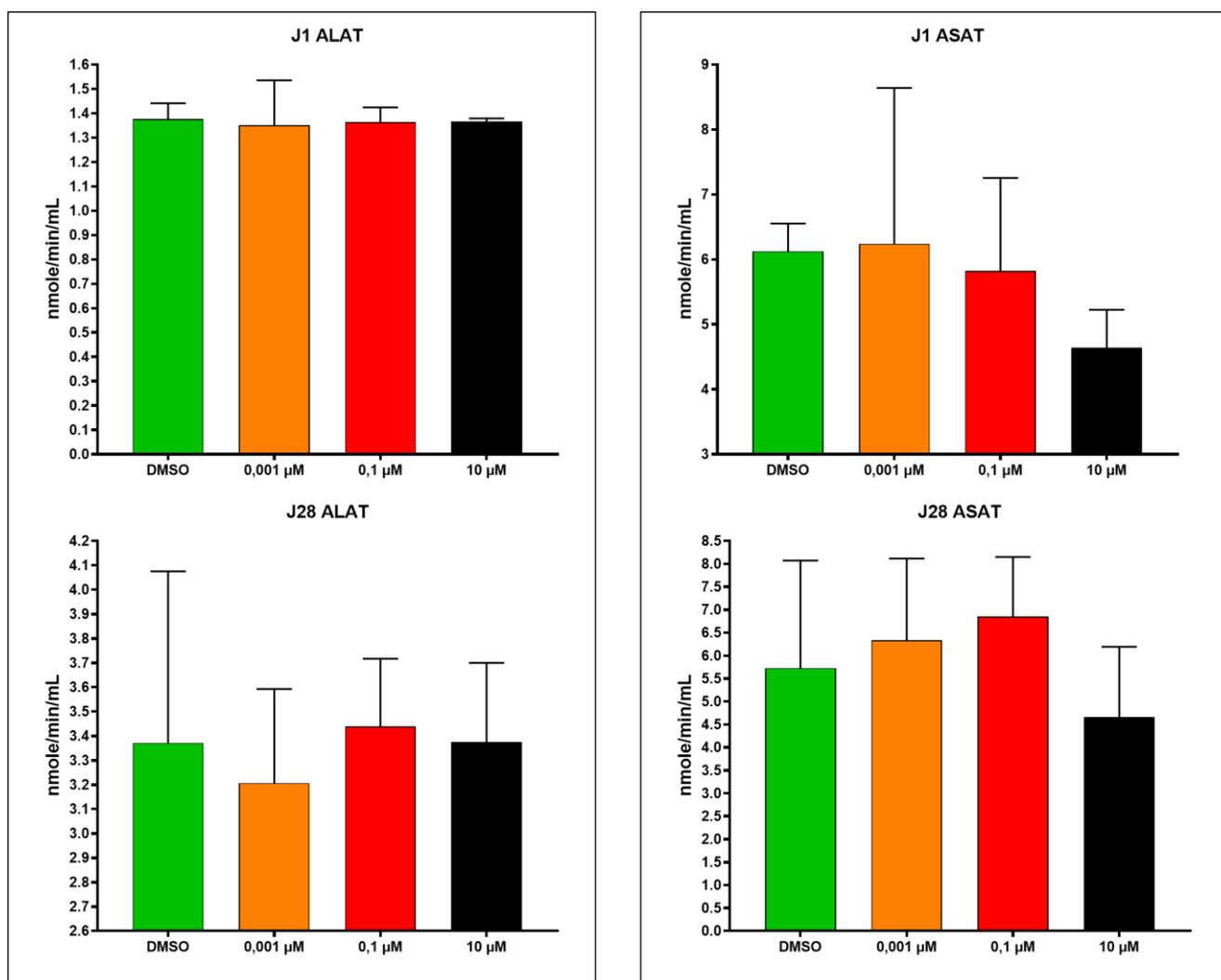


Figure 29 : Dosage des enzymes hépatiques ASAT et ALAT dans les milieux de culture du modèle HepaRG après exposition au PFOA pour 1 jour (A) et 28 jours (B). Le témoin négatif est du DMSO 0,25 %. Les moyennes des activités enzymatiques obtenues ($n=3$) ont été comparées à l'aide d'une ANOVA suivie d'un test post-hoc de Dunnett. Aucune différence significative n'a été observée par rapport au contrôle négatif (DMSO).

4.3 Etude de l'effet du PFOA sur l'accumulation lipidique

4.3.1 Objectif et principe général du test

Beaucoup d'études ont montré une perturbation des taux lipidiques par le PFOA au niveau hépatique. Par exemple, une accumulation de triglycérides a été démontrée au niveau hépatique chez les souris (SV129, C57BL/6N, BALB/c) exposées à de fortes concentrations en PFOA par voie orale (5 à 20 mg/kg/jour) pour des temps d'exposition allant de 3 jours à 14 jours (Tan et al. 2013; Wang et al. 2013; Das et al. 2017). Une augmentation des taux de triglycérides a aussi été observée *in vitro* sur le modèle humain HepaRG après 24 h d'exposition à une forte concentration (200µM) de PFOA (Louisse et al. 2020). Récemment, Franco et ses collaborateurs ont montré une accumulation des lipides intracellulaires après 72 heures d'exposition à 10 nM de PFOA pour ce même modèle HepaRG (Franco et al. 2020). Cependant, l'ensemble de ces études a été réalisé pour des temps d'exposition courts, notamment sur le modèle hépatique humain. Il est donc apparu pertinent d'étudier l'accumulation des lipides dans le modèle HepaRG sur une exposition longue et répétée, afin d'observer si cette accumulation de lipides pouvait être mise en évidence sur des concentrations suffisamment représentatives de l'exposition humaine.

4.3.2 Matériel et méthodes

L'observation des lipides intracellulaires a été réalisée à l'aide du Nile Red, une sonde fluorescente utilisée pour marquer les lipides neutres tels que les triglycérides et le cholestérol sur des cellules vivantes. L'intensité de fluorescence obtenue reflète la quantité de lipides à l'intérieur des cellules. 50 000 cellules ont été déposées dans des puits d'une plaque 96 puits. Les cellules ont été exposées pendant 1 ou 28 jours (exposition répétée) aux concentrations plasmatiques déjà utilisées (10 ; 0,1 et 0,001 µM) ainsi qu'à une forte concentration, proche de la cytotoxicité (200 µM pour 1 jour d'exposition et 100 µM pour 28 jours d'exposition).

L'amiodarone à 10 μM a été utilisée en tant que témoin positif pour induire une accumulation des lipides dans les cellules HepaRG aux mêmes temps d'exposition (exposition répétée) (Anthérieu et al. 2011). Un témoin négatif (DMSO 0,25 %) a aussi été réalisé. Après exposition au PFOA, le milieu de traitement a été retiré des puits et 60 μL de solution de formaldéhyde ont été ajoutés pendant 30 minutes afin de fixer les cellules. Après rinçage des puits, 100 μL de Nile Red à une concentration de 0,05 $\mu\text{g/ml}$ dans du PBS ont été ensuite ajoutés dans chaque puits pendant 30 minutes. Après un nouveau rinçage, 100 μL de PBS seul a été introduit dans chaque puits et la fluorescence a été mesurée sur un TECAN infinite 200 avec une longueur d'onde d'excitation de 531 nm et d'émission de 593 nm.

4.3.3 Résultats et discussion

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 30A. Pour une exposition de 24h, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les différentes concentrations utilisées et le témoin négatif (DMSO 0.25 %), y compris pour l'amiodarone (10 μM), utilisée comme témoin positif. Ce type de problème sur le témoin positif avait déjà été observé dans une étude pour plusieurs molécules induisant l'accumulation de lipides sur le modèle HepaRG, avec d'autres molécules comme la tétracycline (Anthérieu et al. 2011). La durée d'exposition testée (1 jour) ne semble donc pas assez longue pour observer un effet sur l'accumulation des lipides, même dans le cas du témoin positif. L'accumulation des lipides devient significative pour des temps d'exposition plus longs.

Après 28 jours d'exposition (figure 30B), une accumulation significative de lipides a bien été observée pour le témoin positif, ainsi que pour la plus forte concentration en PFOA (100 μM). Ceci montre qu'une exposition longue à une forte concentration de PFOA peut induire une accumulation des lipides au niveau hépatique. Cependant, aucun effet n'a été observé pour les plus faibles concentrations en PFOA.

Nos résultats indiquent donc qu'il n'y a pas d'accumulation des lipides neutres aux concentrations utilisées pour une exposition ponctuelle (1 jour) et chronique (28 jours). Cependant, nous avons pu mettre en évidence une accumulation des lipides au niveau hépatique pour des concentrations supérieures lors d'une exposition à long terme. Ces résultats sont contradictoires avec les expositions à court terme réalisées dans la littérature, où une accumulation des lipides a été démontrée pour une exposition de 24 heures à 200 μM en PFOA (Louisse et al. 2020), ou même à une très faible concentration pour une exposition de 72 heures (10 nM) (Franco et al. 2020). Il est difficile d'expliquer ces différences par rapport à la littérature, le modèle utilisé dans ces études étant aussi le modèle HepaRG. Dans ces études, une quantification de l'accumulation lipidique a été réalisée par mesure de la fluorescence par microscopie. Il est possible que notre méthode via l'utilisation d'un lecteur de plaque soit moins sensible pour mettre en évidence ce type d'effet.

Aucune étude à long terme n'a été réalisée dans la littérature sur un modèle hépatique humain montrant une accumulation des lipides intracellulaires. Seules des études chez l'animal, pouvant atteindre 14 jours d'exposition, viennent en accord de nos observations, indiquant elles aussi une accumulation des lipides au niveau hépatique à de fortes concentrations en PFOA (Tan et al. 2013; Wang et al. 2013; Das et al. 2017).

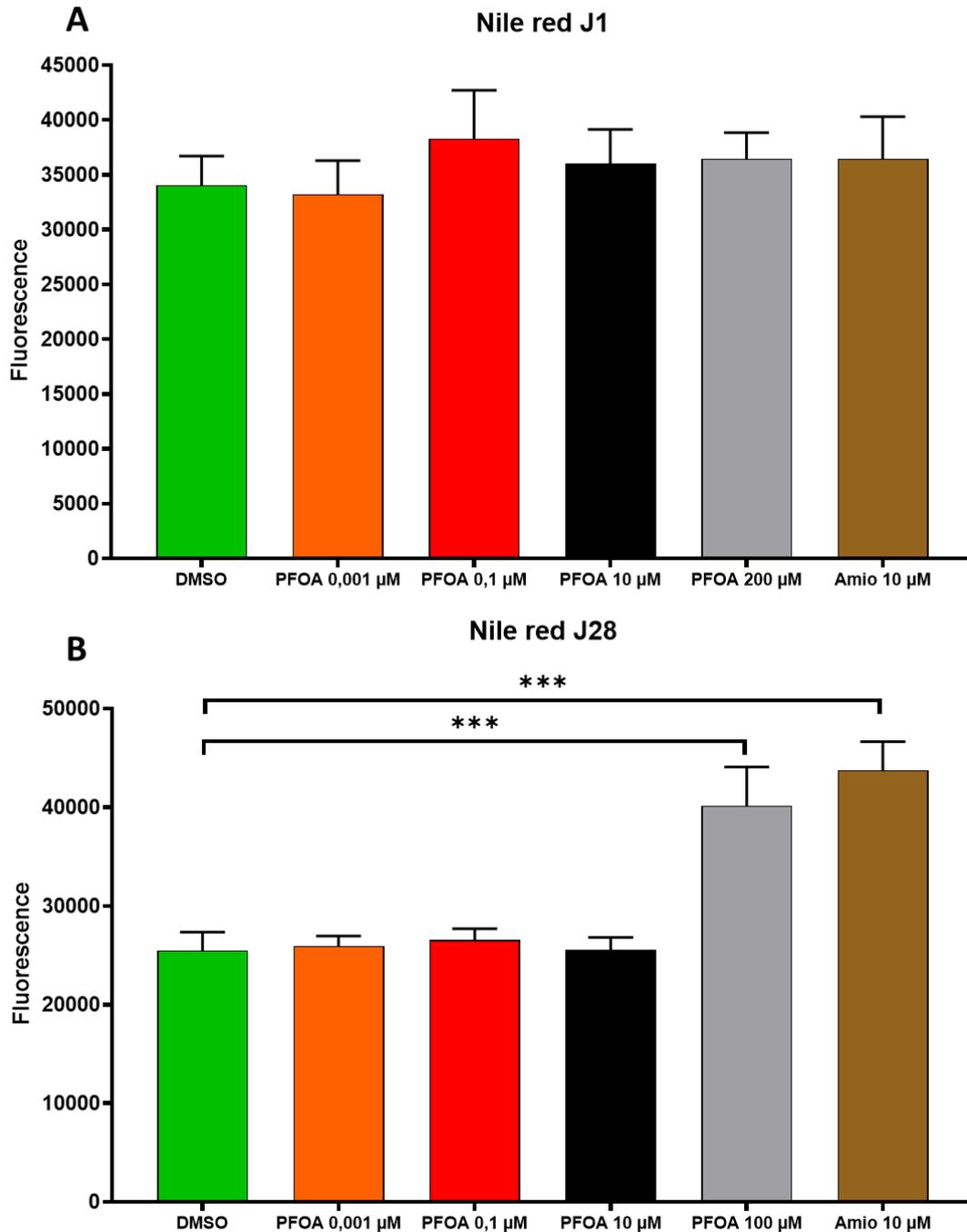


Figure 30 : Dosage de l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans le modèle HepaRG après exposition au PFOA pour 1 jour (A) et 28 jours (B). L'intensité de fluorescence obtenue est proportionnelle à la quantité de lipides à l'intérieur des cellules. Le témoin négatif est du DMSO 0,25 %. Le témoin positif est de l'amiodarone à 10 µM. Les moyennes obtenues (n=8) ont été comparées à l'aide d'une ANOVA suivi d'un test de Dunnett par rapport au contrôle négatif (***) $p < 0,001$.

L'ensemble de ces premiers tests réalisés visant à observer les effets du PFOA sur la physiologie hépatique semblent montrer que le PFOA n'induit pas de diminution de la viabilité cellulaire, de perturbation de l'activité des principales enzymes marqueurs d'une souffrance hépatique ou d'accumulation de lipides neutres pour de faibles concentrations d'exposition. L'ensemble de ces tests a été réalisé pour des concentrations allant de 0,001 à 10 μ M, et pour des durées d'exposition de 1 jour (ponctuel) ou 28 jours (chronique). Lors de cette étude, il a tout de même été démontré une accumulation des lipides intracellulaires lors d'une exposition à une forte concentration en PFOA (100 μ M) confirmant que ce composé est capable d'altérer les voies lipidiques au niveau hépatique. Cependant, comme détaillé en introduction, ces tests manquent parfois de sensibilité pour mettre en évidence les effets d'un composé d'intérêt, particulièrement lors de l'utilisation de faibles concentrations.

4.4 Étude de la pénétration du PFOA et de sa métabolisation dans les cellules HepaRG.

4.4.1 Introduction

Les substances exogènes telles que les médicaments ou certains contaminants alimentaires, peuvent être métabolisées après leur absorption. La métabolisation est le processus de biotransformation d'un composé dans l'organisme permettant de transformer ce composé en un ou plusieurs métabolites, généralement plus hydrophiles et plus facilement éliminables de l'organisme. Ces étapes de biotransformation peuvent être réalisées par plusieurs organes tels que l'intestin ou les reins, mais elles sont majoritairement réalisées par le foie chez l'Homme et l'animal. En excluant les phases d'absorption et d'élimination, le processus de métabolisation peut être divisé en 2 phases (Almazroo et al. 2017) : Une première phase implique des enzymes dites "de fonctionnalisation" qui sont essentiellement des cytochromes P450 (CYP) qui catalysent de nombreuses réactions (hydroxylation, époxidation, réduction, déalkylation, hydrolyse, oxydation). On peut citer par exemple les CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 et CYP3A5 qui métabolisent 90 % des médicaments (Lynch and Price 2007). La phase II implique des enzymes dites "transférases" qui catalysent des réactions greffant des groupements polaires (glucuronide, sulfate, acide aminé...) ou moins polaires (méthyle, acétyle, glutathion) sur le composé parent ou un de ses métabolites de phase I. Ces réactions sont catalysées par des enzymes (glucuronosyltransférase, sulfotransférases, glutathion S-transférases...), mais peuvent être aussi non enzymatiques (Glutathion). Les réactions de biotransformation sont mises en œuvre pour beaucoup de molécules exogènes à l'organisme mais aussi pour des composés endogènes.

En toxicologie, l'étude de la métabolisation d'un composé exogène ingéré par l'organisme présente un intérêt important, car dans la majorité des cas, les étapes de biotransformation permettent d'obtenir un composé qui est moins « toxique » pour l'organisme. Cependant dans certains cas, les métabolites générés peuvent à l'inverse être davantage toxiques pour l'organisme (Baillie and Rettie 2011), ou encore avoir une activité biologique distincte de celle du composé parent. Afin d'évaluer l'ensemble des effets toxiques potentiellement induits par l'exposition à un composé, il est donc important de caractériser ses métabolites et les voies de biotransformation mises en jeu, en isolant à partir de liquides biologiques, de cellules ou de tissus, le composé d'intérêt et ses métabolites, pour ensuite les identifier. Cette tâche peut être complexe, et il existe de nombreuses molécules dont le métabolisme n'est pas complètement élucidé.

Différentes techniques peuvent être mises en œuvre pour suivre la métabolisation d'un composé dans un organisme. Il est possible d'utiliser les techniques analytiques classiques avec des isotopes stables. Dans une molécule, on distingue pour un atome donné des isotopes stables tels que le ^{12}C et le ^{13}C (pour le carbone) et des isotopes radioactifs comme le ^{14}C qui peuvent se transformer spontanément en d'autres atomes en émettant simultanément des particules de matière et de l'énergie. L'utilisation de molécules marquées radioactives est très performante pour suivre la métabolisation d'un composé d'intérêt. Un isotope radioactif peut être incorporé dans une molécule que l'on souhaite suivre dans l'organisme. Il est ainsi possible d'établir des bilans de radioactivité *in vivo* ou *in vitro*, voire de préciser la localisation de la molécule radiomarquée étudiée. Par ailleurs, l'utilisation du radio-profilage des échantillons par analyse radio-HPLC permet également de rechercher et de quantifier le composé parent et ses éventuels métabolites. La limite d'utilisation de ces techniques, faisant appel à des traceurs radioactifs, réside dans la difficulté à synthétiser les molécules radiomarquées, dans leur coût, dans la nécessité de disposer des autorisations de détention de radio-isotopes, et dans le besoin

d'appareils de mesure dédiés (extraction, comptage, radio-profilage). Lors de cette thèse, une molécule de PFOA radiomarquée au carbone ^{14}C a été utilisée avec le modèle HepaRG. L'objectif de cette partie de l'étude était de déterminer si le PFOA pouvait être métabolisé par ces cellules hépatiques. L'utilisation de la lignée cellulaire HepaRG, qui exprime de nombreuses enzymes de biotransformation fonctionnelles, est logiquement apparue comme un modèle permettant de rechercher une éventuelle métabolisation du PFOA. De plus, nous souhaitons étudier la dynamique de pénétration du PFOA dans les cellules HepaRG. Pour ce faire, nous avons réalisé, à l'aide du [^{14}C -PFOA], une cinétique sur une période de temps allant de 10 minutes à 48 heures. Cette étude avait pour objectif de préciser pour la première fois dans quelle proportion le PFOA pénètre dans les cellules et est susceptible d'atteindre ses cibles biologiques. L'objectif était également d'adapter le moment de l'arrêt du métabolisme cellulaire lors des études métabolomiques. Cette cinétique a aussi été réalisée en parallèle avec du bisphénol A (^{14}C -BPA) radiomarqué, utilisé en tant que témoin capable de pénétrer dans les cellules afin d'avoir un point de comparaison avec une molécule connue pour être métabolisée par les cellules HepaRG (Bucher et al. 2017).

4.4.2 Matériel et méthodes

a. Exposition des cellules HepaRG à du PFOA radiomarqué

Lors de cette étude, 350 000 cellules HepaRG ont été introduites dans chaque puits d'une plaque 12 puits (Dutsher, France). Le PFOA radiomarqué (activité spécifique = 55mCi/mmol) a été solubilisé dans du DMSO et 200 000 désintégrations par minute (dpm) (3333 Becquerel (Bq)) de PFOA avec 1 mL de milieu de traitement ont été introduits dans chaque puits soit à une concentration proche de 1,6 μM . Du PFOA non marqué a été utilisé afin de compléter les solutions préparées, pour parvenir aux concentrations désirées. Les cellules HepaRG ont dans un premier temps été exposées à une gamme de concentration (1,6 ; 5 ; 10 ; 50 ; 100 μM), avec pour chaque

concentration 3 333 Bq de [¹⁴C-PFOA] afin d'étudier la distribution et la biotransformation éventuelle du PFOA par les cellules, après 24 heures d'exposition. Le tableau 9 résume l'ensemble des paramètres utilisés pour obtenir ces solutions radioactives à ces différentes concentrations. Pour chaque expérience, un échantillon blanc sans cellule a aussi été réalisé afin d'observer la stabilité du PFOA au cours du temps dans le milieu de culture. Dans un second temps, les cellules HepaRG ont été exposées au PFOA à 10 µM à différents temps d'exposition (cinétique allant de 10 minutes à 48 heures d'exposition). Cette cinétique a aussi été reproduite pour l'exposition des cellules HepaRG à 10 µM de Bisphénol A (BPA) radiomarquées (activité spécifique = 106 mCi/mole).

Pour chaque expérience, toutes les fractions susceptibles de contenir du PFOA radiomarqué (milieux extracellulaires, contenus intracellulaires et solution de lavage) ont été collectées. Les contenus intracellulaires ont été extraits selon le protocole suivant : les cellules ont été lavées avec 1 mL de PBS puis les cellules ont été lysées à l'aide d'une solution constituée d'acétonitrile et d'eau (50/50, v/v, 2 fois 500µL) et récupérées par grattage. Toutes les fractions obtenues ont été stockées à -20°C jusqu'à analyse de la radioactivité. Ainsi, pour chaque temps de cette cinétique, les bilans de distribution du PFOA et du BPA radiomarquée ont pu être établis en prenant en compte la composante intracellulaire, les solutions de lavage et le milieu extracellulaire.

Tableau 9 : Ensemble des paramètres permettant d'obtenir des solutions radioactives en PFOA à 3 333 Bq pour différentes concentrations en PFOA.

Concentration	Volume de solution	Nombre de nmol en PFOA requis	nmoles apportées par le ¹⁴ C-PFOA	nmoles apportées par le PFOA non marqué	Conversion en (μmol/mL)	Conversion en concentration massique (mg/mL)
1,6 μM	20 μL	13,1	13,1	0	0	0
5 μM	15 μL	30	9,8	20,2	1,35	0,56
10 μM	15 μL	60	9,8	50,2	3,35	1,39
50 μM	15 μL	300	9,8	290,2	19,35	8,01
100 μM	15 μL	600	9,8	590,2	39,35	16,29

b. Quantification de la radioactivité

La radioactivité a été quantifiée à l'aide d'un compteur à scintillation (Tri-Carb 2910-TR). En résumé, cette technique consiste à mélanger un échantillon contenant les molécules radiomarquées avec un liquide scintillant capable de transformer les rayonnements ionisants issus des désintégrations radioactives en lumière, détectable et quantifiable par cet appareil de mesure. Pour quantifier la radioactivité dans les différentes solutions de milieux extracellulaires, lavages et contenus intracellulaires obtenues, 100 μL de chaque fraction ont été introduits dans une fiole de comptage et complétés par 2 mL de liquide scintillant (Ultima Gold, Sigma). Chaque échantillon a été analysé en triplicat pendant 5 minutes afin d'obtenir le nombre de coups par minute correspondant à la mesure de la radioactivité effectuée par le compteur de radioactivité. Chaque valeur de coups par minute a été convertie en dpm en prenant en compte la nature du radioélément (¹⁴C), pour déterminer la quantité de radioactivité se trouvant dans l'échantillon.

c. Radio-profilage des échantillons cellulaires par analyse radio-HPLC

A la suite de cette quantification, l'utilisation d'une HPLC couplée à un détecteur de radioactivité a permis de rechercher une éventuelle biotransformation du PFOA. Le profilage radio-HPLC des molécules étudiées et de leurs métabolites a été réalisé en utilisant un système chromatographique en phase inverse couplé à un détecteur de radioactivité en ligne (radio-HPLC). Le système chromatographique utilisé était l'Ultimate 3000 (Thermo Scientific) couplé pour la quantification à un détecteur de radioactivité en ligne Flo-One 610TR (Perkin Elmer). Les analyses ont été réalisées grâce à une colonne Zorbax SB-C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) (Agilent), avec une pré-colonne EC 4/2 Universal RP (Macherey-Nagel) à 25°C. Le débit du liquide scintillant (FloScint II) était de 2 mL/min, avec une cellule de détection de 500 µL.

Les phases mobiles utilisées pour le PFOA étaient, phase A : l'acétate d'ammonium 20 mM pH 3,5 (pH ajusté avec acide acétique) / acétonitrile (95/5, v/v), phase B : 100 % acétonitrile. Gradient utilisé : 0-4 min : 0% B; 4-6 min: montée linéaire vers 30% B ; 6-21 min : 30 % B; 21-23 min: montée linéaire vers 50% B, 23-33 min : 50 % B, 33-34 min montée linéaire vers 100 % B ; 34-44 min : 100% B ; 44-45 min retour aux conditions initiales.

Pour le BPA, la phase A était de l'acétate d'ammonium 20 mM pH 3,5 (pH ajusté avec acide acétique) / acétonitrile, la phase B était de l'acétate d'ammonium 20 mM pH 3,5 (pH ajusté avec de l'acide acétique) / acétonitrile (10/90 v/v). Gradient utilisé : 0-4 min : 0 % B ; 4-6 min montée linéaire à 15 % B, 6-16 min 15% B ; 16-18 min montée linéaire jusqu'à 25 % B ; 18-28 min : 25 % B ; 28-30 min montée linéaire à 30 % B ; 30-37 min : 30 % B ; 37-39 min montée linéaire à 70 % B ; 39-50 min : 70 % B ; 50-52 min montée linéaire à 100 % B ; 52-62 min : 100 % B ; 62-70 min retour aux conditions initiales.

Les radio-chromatogrammes obtenus ont été retraités à l'aide du logiciel A500 (Perkin Elmer) après élimination d'un bruit de fond correspondant à 20 coups par minute et application d'un coefficient d'efficacité de mesure dépendant de l'isotope et de l'appareil, fixé à 80 % pour le ^{14}C . Les proportions respectives de composés parents et de leurs métabolites ont été calculées par intégration de l'aire des pics des radio-chromatogrammes obtenus pour chaque échantillon. La radio-pureté des molécules a été vérifiée avant l'expérience et avec les échantillons blancs sans cellule réalisé lors des expériences. Pour les deux molécules, une pureté de 99 % a été obtenue.

4.4.3 Résultats et discussion

a. Absence de métabolisation du PFOA par le modèle HepaRG

Après quantification de la radioactivité, la proportion de radioactivité retrouvée a été calculée pour chaque fraction. En moyenne, 96 % de la radioactivité introduite a été retrouvée dans ces trois fractions, en prenant comme base la quantité de radioactivité théorique introduite sur les cellules. Plus de 90 % de la radioactivité a été retrouvée dans le milieu extracellulaire pour chaque puits. Moins de 2 % et 1% de la radioactivité ont été retrouvés dans les solutions de lavage et dans les contenus intracellulaires, respectivement. Le tableau 10 résume l'ensemble des pourcentages moyens obtenus pour chaque concentration en PFOA testée.

L'analyse des métabolites radiomarqués des milieux extracellulaires en radio-HPLC a démontré l'absence de métabolisation du PFOA pour toutes les concentrations étudiées. En effet, comme illustré sur la figure 31 pour la concentration de 10 μM , un seul et unique pic possédant un temps de rétention à 27 minutes, correspondant au temps de rétention du PFOA, était présent sur les chromatogrammes obtenus. Les résultats étaient identiques pour chacune des concentrations testées. Ce pic était aussi présent dans l'échantillon sans cellule, indiquant que le PFOA est stable au cours du temps dans le milieu de culture. Ces résultats concordent avec les autres

études disponibles dans la littérature, utilisant du PFOA radiomarqué et qui n'ont pas non plus mis en évidence de métabolisation de ce composé chez les rats après 28 jours d'exposition ou dans des microsomes de foie, de rein ou d'intestin chez l'Homme et le rat (Kemper and Nabb 2005; Vanden Heuvel et al. 2006). Néanmoins, c'est la première fois que ce résultat est confirmé pour un modèle de cellules hépatiques métaboliquement compétent. Ceci implique donc que pour un éventuel effet biologique démontré, celui-ci proviendra uniquement du PFOA et non d'un ou plusieurs métabolites issus d'une biotransformation de la molécule parente.

L'estimation de la proportion de radioactivité dans chacune des 3 fractions récoltées nous a aussi permis d'observer qu'une très faible pénétration du PFOA était observée après 24 heures d'exposition (inférieure à 1 %), et ce pour l'ensemble des concentrations utilisées. Ces observations ont posé la question d'une proportion de radioactivité plus élevée dans les contenus intracellulaire pour des temps plus court. C'est pourquoi une cinétique a été envisagé pour étudier la dynamique de pénétration du PFOA dans les cellules HepaRG sur des temps plus courts.

Tableau 10 : pourcentage moyen de radioactivité retrouvée dans les milieux extracellulaires, les solutions de lavage et les contenus intracellulaires pour chaque concentration en PFOA. (SS cell : contrôles sans cellules), chaque fraction a été compté en triplicat et l'écart type a été obtenu pour chaque moyenne.

PFOA	moyenne extra (%)	moyenne lavage (%)	moyenne intra (%)	Totaux (%)
1,6 µM	90,38 ± 0,72	1,28 ± 0,15	0,81 ± 0,05	92,47
5 µM	94,41 ± 1,69	1,47 ± 0,07	0,87 ± 0,03	96,75
10 µM	95,19 ± 1,42	1,84 ± 0,09	0,82 ± 0,03	97,85
50 µM	95,13 ± 3,64	1,64 ± 0,05	0,87 ± 0,14	97,64
100 µM	95,60 ± 1,16	1,77 ± 0,17	0,73 ± 0,06	98,10
Ss cell	93,31 ± 7,86	1,28 ± 0,09	0,61 ± 0,05	95,20

b. La faible pénétration du PFOA dans les cellules

Afin de suivre la cinétique de pénétration du PFOA dans les cellules HepaRG, celles-ci ont ensuite été exposées au PFOA radiomarqué (10 μ M) à différentes durées (10 min, 1h, 4h, 12h, 24h, 48h) et la radioactivité a été mesurée dans les milieux extracellulaires, les solutions de lavage et les contenus intracellulaires à l'issue de chaque période d'exposition. De plus, l'ensemble des cônes de pipetage et les grattoirs a été récupéré afin de mieux estimer les potentielles pertes de PFOA radiomarqué au cours de l'expérience. Pour ces raisons, un frottis de chaque puits a également été réalisé afin d'estimer la perte de radioactivité due à une éventuelle adsorption des molécules sur le plastique, et compléter les bilans. Une cinétique similaire a été réalisée en parallèle avec du BPA radiomarqué, qui a été utilisé en tant que contrôle positif, sachant qu'il a été montré que le BPA pénètre dans les cellules HepaRG et est largement métabolisé par ces cellules (Bucher et al. 2017).

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 32. Ils indiquent que la majorité de la radioactivité retrouvée se trouve dans les milieux extracellulaires pour les deux molécules testées. Un faible pourcentage de radioactivité (environ 1 %) a été retrouvée dans les solutions de lavage ce qui correspond potentiellement à des restes de milieux extracellulaires dans les puits. Pour les quantités de radioactivité retrouvées dans les contenus intracellulaires, une ANOVA suivie d'un test post-Hoc de Tukey permettant de comparer les pourcentages moyens obtenus entre chaque temps de cinétique, a été réalisée. Les résultats indiquent une différence significative pour le PFOA entre chaque temps de cinétique et le contrôle sans cellules. Ceci indique que le PFOA pénètre dans les cellules HepaRG et que les quantités mesurées ne proviennent pas uniquement d'un reste de milieu extracellulaire. Seuls les pourcentages moyens obtenus pour 48 heures d'exposition ne semblent pas être significativement différents du contrôle sans cellule. Les résultats obtenus pour le point de cinétique à 48 h peuvent s'expliquer par une forte perte de la radioactivité dans un cône de pipetage

(10 % de la radioactivité), observée pour ce temps, ce qui réduit fortement le pourcentage de radioactivité intracellulaire obtenu.

Au contraire, comme attendu, le BPA semble pénétrer très rapidement dans les cellules où 3 % de la radioactivité sont retrouvés dans les contenus cellulaires après 10 minutes d'exposition. Les analyses statistiques montrent une différence significative pour chaque temps d'exposition entre eux indiquant que la quantité de BPA intracellulaire dans les cellules HepaRG diminue au cours du temps. Seul le puits à 48 heures d'exposition n'est pas significativement différent de l'échantillon sans cellule. Ces échantillons ont été analysés par radio-HPLC et les résultats obtenus ont mis en évidence une biotransformation rapide du BPA qui est totalement métabolisé après 48 heures d'exposition, les métabolites étant excrétés par les cellules.

Ces résultats montrent donc que le PFOA et le BPA pénètrent dans les cellules HepaRG. Cependant, le faible pourcentage de radioactivité retrouvée dans les contenus intracellulaires pour le PFOA suggère que la pénétration du PFOA dans les cellules HepaRG est faible (inférieure à 1 %). Une étude supplémentaire a été réalisée avec des temps d'exposition inférieurs à 10 minutes afin de tester si une pénétration plus élevée de PFOA pouvait avoir lieu dans les cellules dans des intervalles de temps plus rapides. Des résultats identiques ont été obtenus. Ils suggèrent que le PFOA pénètre quasiment immédiatement dans les cellules après une mise en contact, mais en faible quantité.

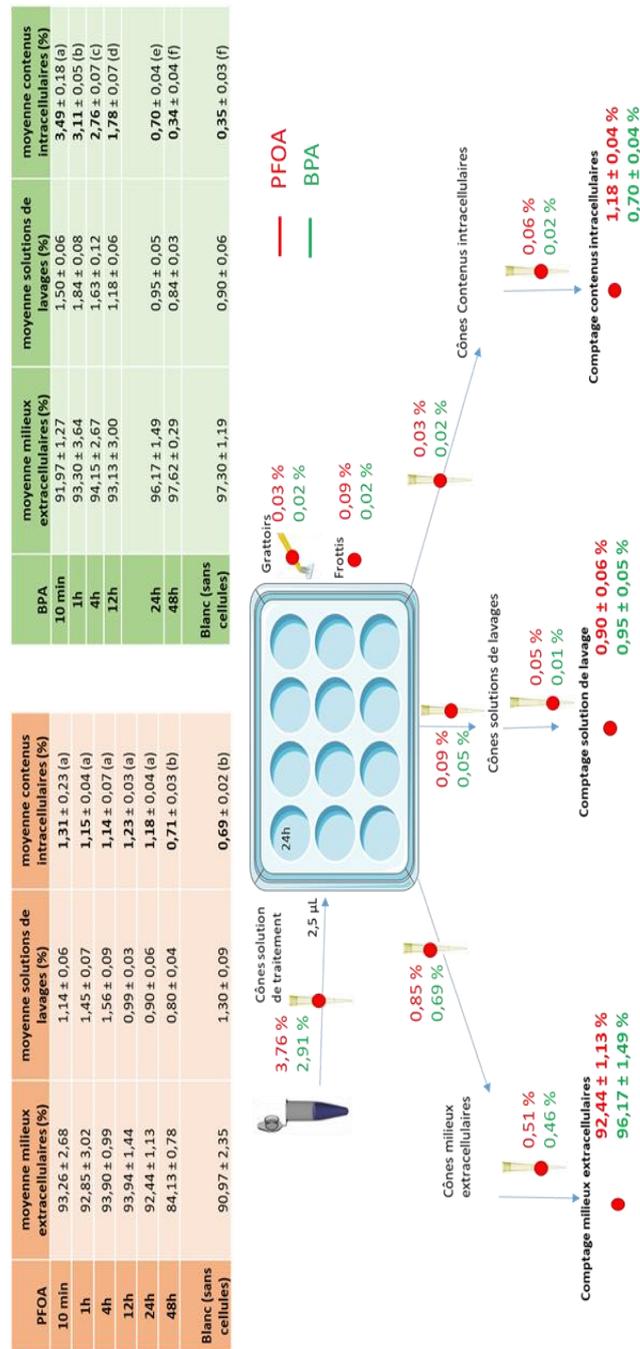


Figure 32 : Tableaux bilan de la radioactivité moyenne retrouvée dans les milieux extracellulaires, solutions de lavages et contenus intracellulaires pour le PFOA et le BPA (10 μ M) après plusieurs temps d'exposition. Le bilan de radioactivité permettant d'estimer la répartition globale de la radioactivité durant l'expérience a été représenté sur le schéma de l'expérience. Les pourcentages obtenus après 24h d'exposition ont été indiqués pour le PFOA (en rouge) et le BPA (en vert). Les comptages de chaque fraction a été réalisé en triplica. Une ANOVA suivie d'un test post hoc de Tukey a été réalisée sur les contenus intracellulaires afin de comparer les pourcentages moyens obtenu entre chaque temps. Pour les contenus intracellulaires, 2 lettres différentes entre deux moyennes indiquent qu'elles sont significativement différentes (p -value < 0,05).

De nombreuses études ont pu détecter la présence de PFOA dans des échantillons de foie humain (Maestri et al. 2006; Pérez et al. 2013). D'autres études témoignent d'une activation intracellulaire du récepteur nucléaire PPAR α chez les animaux (Rosen et al. 2017), et donc de la pénétration intracellulaire du PFOA. Cependant, le faible pourcentage de pénétration du PFOA dans les cellules HepaRG observé lors de cette étude peut amener à s'interroger quant à la capacité de cette faible quantité de PFOA à induire un effet biologique dans des modèles cellulaires. Cette étude permet aussi de mieux évaluer l'exposition réelle d'un modèle cellulaire à ce composé. En effet, il existe de nombreuses limitations quant à l'accès de ce composé aux hépatocytes en culture, comparé à la situation *in vivo*, et notamment chez l'Homme. De plus, le modèle HepaRG est un modèle immortalisé pouvant être muté sur de nombreux transporteurs membranaires. Cette étude ne permet donc pas de conclure complètement sur les modalités d'exposition cellulaire, notamment parce que ce type de modèle, comparé à l'*in vivo*, pourrait ne pas rendre compte des mécanismes de transport du PFOA à travers les membranes. Quoi qu'il en soit, nos résultats posent la question de la pénétration et des concentrations de PFOA réellement atteintes sur des modèles alternatifs *in vitro* cellulaires, ainsi que des concentrations effectives intra-cellulaires, ayant été démontrées comme initiant une réponse biologique dans d'autres études.

Comme représenté sur le schéma de la figure 32, la radioactivité mesurée sur l'ensemble des cônes de pipetage, des grattoirs et sur le frottis de chaque puits permet aussi de montrer qu'une partie du PFOA semble se fixer au plastique (polypropylène). Les résultats montrent que plus la solution qui est prélevée est concentrée en PFOA, plus le pourcentage de radioactivité retrouvé sur le plastique est élevé, allant jusqu'à plus de 3 % lors du pipetage d'une solution très concentrée en PFOA. De plus, les pourcentages obtenus après comptage sur le plastique sont dans chaque cas supérieurs pour le PFOA, comparé au BPA. Ceci indique qu'une certaine quantité de PFOA peut rester fixée aux plastiques lors d'une

expérimentation *in vitro*. Ces observations sont en accord avec les quelques données disponibles dans la littérature, qui montrent une fixation du ^{14}C -PFOA d'environ 32-45% au plastique en polypropylène (Lath et al. 2019). Cependant, dans notre cas où du matériel en polypropylène a aussi été utilisé, ces pourcentages ne sont pas aussi élevés et sont inférieurs à 10 % en prenant en compte l'ensemble des cônes de pipetage ainsi que le frottis et le grattoir.

4.4.4 Conclusions

D'après les résultats obtenus avec les techniques de radiomarquage, le PFOA n'est pas métabolisé par les cellules HepaRG, ce qui indique que l'effet biologique induit par l'exposition au PFOA sera directement lié à cette molécule et non à l'un de ces métabolites. De plus, le PFOA semble pénétrer faiblement dans les cellules HepaRG (inférieure à 1 %). Il semble aussi partiellement se fixer sur les plastiques, ce qui suggère que la concentration à laquelle les cellules sont réellement exposées est peut-être surestimée (Lath et al. 2019).

4.5 Exploration des modulations métaboliques induites par le PFOA par métabolomique

4.5.1 Introduction

Le PFOA est un contaminant alimentaire fortement suspecté d'affecter le métabolisme hépatique chez l'Homme. L'utilisation de la métabolomique *in vivo* ou *in vitro* sur des modèles animaux, ou *in vitro* sur des modèles humains a montré que le PFOA pouvait impacter plusieurs voies métaboliques au niveau hépatique. Ces études ont été résumées dans la partie 1.3.4.b en introduction de ce manuscrit (tableau 8). Elles indiquent que le PFOA semble affecter particulièrement les voies lipidiques au niveau hépatique. Tan et ses collaborateurs ont notamment montré par une étude métabolomique une augmentation de nombreux lipides tels que les acylcarnitines dans le foie de souris mâles C57BL/6N exposées par voie orale à une forte concentration (5 mg/kg/jour) de PFOA pendant 3 semaines. Ils ont également mis en évidence une diminution de l'ensemble des métabolites liés au métabolisme du glucose (glycolyse et cycle de Krebs) et une modulation des acides aminés (Tan et al. 2013). Des effets similaires ont aussi été démontrés sur une étude exposant des souris par voie orale à de fortes concentrations en PFOA (0,5 à 2,5 mg/kg/jour) pendant 28 jours, suggérant un impact sur certains acides aminés, sur le cycle de Krebs, les acides nucléiques et le métabolisme énergétique (Yu et al. 2016). L'ensemble des effets rapportés chez les animaux sur les acylcarnitines, les acides aminés et les métabolites liés au métabolisme du glucose a aussi été observé sur le modèle cellulaire hépatique humain L-02 exposé à de fortes concentrations en PFOA à 120 μM après 3 jours d'exposition (Peng et al. 2013). Des études sur le modèle HepG2 et le modèle HepaRG ont démontré une diminution des taux de cholestérol et des acides biliaires intracellulaires après 24 heures d'exposition au PFOA pour des concentrations supérieures à 20 μM (Behr et al. 2020).

De plus, Franco et ses collaborateurs ont rapporté une augmentation des triglycérides après une exposition des cellules HepaRG à de faibles

concentrations (inférieure à 10 μM) en PFOA, suite à 3 jours d'exposition (Franco et al. 2020). Louisse et ses collaborateurs ont aussi montré une accumulation des triglycérides dans le modèle HepaRG, mais uniquement après exposition à de fortes concentrations en PFOA (200 μM) pendant 24 heures (Louisse et al. 2020).

Ainsi, une majorité de ces études a été menée avec l'utilisation de fortes concentration (généralement supérieures à 100 μM), pas nécessairement représentatives des conditions réelles de l'exposition humaine au PFOA. L'objectif principal de cette thèse était d'étudier les effets de ce composé sur le foie chez l'Homme, à des concentrations *in vitro* suffisamment cohérentes avec les concentrations plasmatiques retrouvées chez l'Homme, pour mieux comprendre les effets de l'exposition à ce contaminant alimentaire. Pour cela nous avons choisi d'exposer des cellules hépatiques HepaRG à 3 concentrations de PFOA avec plusieurs modalités d'exposition (24h et 28j). Nous avons combiné des analyses de métabolomiques à la fois ciblées et non ciblées sur les échantillons intracellulaires. Les analyses de métabolomique ciblée sur les acides aminés, les principaux métabolites impliqués dans les voies du métabolisme énergétique cellulaire (cycle de Krebs, voie des pentoses phosphates, glycolyse ...), les acides nucléiques et les principales classes de lipides (Ceramides (CER), Sphingomyélines (SM), Phosphocholines (PC), Phosphoéthanolamines (PE), phosphoinositols (PI) et lipides neutres (cholestérol et Triglycérides (TG)) avaient pour objectif de caractériser et de préciser la modulation des voies déjà suspectées d'être altérées par le PFOA. Les analyses de métabolomique non ciblées, à l'inverse, avaient comme objectif principal de nous permettre de mettre en évidence une éventuelle modulation plus globale du métabolisme, avec l'altération de parties du métabolisme non encore identifiées.

Dans cette partie, l'étude métabolomique des effets du PFOA a été réalisée en appliquant les développements méthodologiques réalisés et décrits dans la partie 3 de ce manuscrit.

4.5.2 Matériel et méthodes

a. Modèle cellulaire et scénarios d'expositions

Les analyses métabolomiques ont été réalisées sur des cellules HepaRG provenant d'un même passage cellulaire (P16), afin de limiter la variabilité liée aux différents passages. Pour chaque expérience, 500 000 cellules HepaRG différenciées ont été déposées sur une lamelle de verre dans les puits d'une plaque 6 puits. 72 heures après le dépôt (afin de limiter le stress pouvant survenir lors du processus de décollement des cellules de la flasque), les cellules ont été exposées à 3 concentrations différentes de PFOA (0,001 ; 0,1 et 10 μ M, dans 2 mL de milieu extracellulaire) selon 2 scénarios d'exposition : une exposition unique (1 jour) et une exposition chronique (28 jours). Pour l'exposition de 28 jours, les milieux extracellulaires ont été changés tous les 2 jours afin de limiter le stress cellulaire des changements de milieu, et l'exposition au PFOA a par conséquent été renouvelée tous les 2 jours. Un groupe contrôle avec cellules sans traitement (DMSO 0,25 %) et un groupe contrôle sans cellules ont également été réalisés. Pour toutes ces expériences, 3 réplicas biologiques et 6 réplicas techniques (n=18 par condition) ont été réalisés pour chaque condition.

b. Préparation des échantillons et analyses métabolomiques par spectrométrie de masse

À la fin du temps d'exposition, le protocole de fast-quenching qui a été détaillé dans la partie 3.1.2.b a été appliqué. Par la suite, les échantillons ont été stockés à -80°C jusqu'au moment de l'analyse. L'extraction des métabolites a été réalisée selon le protocole de double extraction détaillé dans la partie 3.3.2.b (Villaret-Cazadamont et al. 2020). En résumé, 1 mL d'eau et 2,5 mL de dichlorométhane ont été ajoutés à chaque échantillon afin d'obtenir une phase aqueuse (polaire) et une phase organique (apolaire). Ces deux phases ont été récupérées, évaporées à sec, puis reprises dans des solvants adaptés pour les analyses métabolomiques. La

phase aqueuse a permis de réaliser des analyses métabolomiques ciblées pour obtenir les concentrations ou abondances relatives pour les acides aminés et les métabolites énergétiques. La phase organique a permis d'obtenir les abondances relatives pour les lipides neutres et les phospholipides. Les paramètres utilisés pour l'ensemble de ces analyses ont été détaillés en annexe 1. De plus, des analyses de métabolomique non ciblée ont aussi été réalisées pour la phase aqueuse (acides aminés et métabolites énergétiques) en SDM, en modes positif et négatif. L'ensemble des paramètres utilisés pour ces analyses sont détaillés en annexe 2.

c. Normalisation des échantillons : méthode de Bradford

L'objectif de cette étape est de normaliser les valeurs obtenues par la quantité de cellules estimée pour chaque échantillon. Pour cela, la quantité de protéines est utilisée comme une estimation de la quantité de cellules. La quantification des protéines a été réalisée selon la méthode de Bradford, qui est très sensible, rapide et simple à mettre en œuvre (Bradford 1976). Cette technique utilise le bleu de Coomassie qui est capable de se fixer sur l'arginine, l'histidine, la lysine et les acides aminés aromatiques hydrophobes présents dans les chaînes peptidiques des protéines. Suite à cette fixation, la couleur du réactif initialement marron est modifiée et devient bleue. L'intensité de la couleur bleue est ainsi proportionnelle à la quantité de protéines dans l'échantillon. Pour le dosage des protéines, 100 μ L de chaque échantillon ont été récupérés puis évaporés à sec sous flux d'azote. L'échantillon a ensuite été repris dans 50 μ L de NaOH à 0,1M et laissé pendant au minimum 12 h afin de dérouler les protéines présentes dans les échantillons. Pour estimer la concentration en protéines, une gamme étalon a été réalisée avec de l'albumine extraite de sérum bovin. Dans une plaque 96 puits, 15 μ L de chaque échantillon et de solution étalon ont été pipetés en duplicata dans les puits, puis 250 μ L de réactif de Bradford dilué par 5 dans du PBS a été introduit dans chaque puits. La plaque a été laissée 20 minutes à l'obscurité et l'absorbance a été lue à 595 nm. Les concentrations ou les abondances relatives obtenues en

métabolomique ciblée ont été divisées par les concentrations de protéines dosées pour chaque échantillon. De la même façon, l'ensemble des aires obtenues pour chaque variable en métabolomique non ciblée a aussi été normalisée par la concentration en protéines à la fin du processus de filtration de ces données.

d. Analyses statistiques

Concernant les analyses métabolomiques par SDM ciblée, les valeurs de concentrations ou les abondances relatives obtenues pour chaque métabolite ont été comparées à l'aide d'une ANOVA à un facteur (concentration de PFOA) pour chaque durée d'exposition séparément, suivie d'un test post-hoc de Tukey pour comparer les différentes concentrations testées. Pour les analyses métabolomiques par SDM non ciblée, des analyses multivariées ont été réalisées pour étudier l'effet du PFOA sur le métabolome. L'analyse en composantes principales (ACP) a d'abord été effectuée pour mettre en évidence des clusters et détecter d'éventuelles valeurs aberrantes dans les échantillons. Les données obtenues pour chaque temps d'exposition ont été transformées avec une transformation logarithmique afin de les normaliser (Di Guida et al. 2016) et ont été standardisées par une standardisation Pareto. Cette méthode de standardisation a été préférée à la standardisation classique car elle permet de donner plus de poids aux variables avec des intensités plus fortes, et moins de poids aux variables avec une plus forte variabilité pouvant être du bruit (Li et al. 2016). Des analyses discriminantes des moindres carrés partiels avec régression orthogonale (OPLS-DA) ont été réalisées pour modéliser le lien entre chaque concentration de PFOA et les données de métabolomique (comparaison PFOA vs. DMSO pour chaque concentration). Pour chaque modèle, le paramètre R^2 représente la variance expliquée. La capacité prédictive du modèle est estimée par le paramètre Q^2 , calculé par validation croisée. En général, un modèle est considéré valide s'il a un $R^2 > 50\%$ et un $Q^2 > 0,4$ (McCombie et al. 2009). La robustesse des modèles OPLS-DA a été évaluée à l'aide d'un test des permutations, réalisé avec 200

permutations. Un modèle est considéré comme robuste si la valeur d'interception de la droite Q^2 à l'origine est inférieure à 0,05 (Lapins et al. 2008). Les variables discriminantes, c'est-à-dire contribuant le plus à la séparation des groupes dans les modèles obtenus, ont été déterminées par leur valeur « d'importance de la variable dans la projection » (VIP). La significativité de l'effet du PFOA sur chacune des variables avec une valeur de $VIP > 1$ a été testée par un test de Student, avec application d'une correction FDR (False Discovery rate) pour prendre en compte les tests multiples. Les variables avec une valeur de $VIP > 1$ et une p-value corrigée $< 0,05$ ont été considérées comme discriminantes. Les analyses statistiques univariées ont été réalisées avec les logiciels GraphPad (version 8.4.1) et R (s0) et le logiciel SIMCA-P (V15, Umetrics AB, Umea, Sweden) a été utilisé pour réaliser les analyses multivariées.

4.5.3 Résultats et discussion

a. Analyses métabolomiques ciblées

Les analyses métabolomiques ciblées réalisées après 1 jour et 28 jours d'exposition ont permis d'obtenir les concentrations et abondances relatives de 49 métabolites polaires et de 82 lipides. Après 1 jour d'exposition au PFOA, des différences significatives ont été observées pour l'ensemble des 19 acides aminés mesurés, avec des concentrations qui semblent diminuées dans les cellules exposées au PFOA, et ce pour les 3 concentrations. Le tableau 11 résume l'ensemble des résultats obtenus pour les acides aminés pour chacune des concentrations de PFOA.

Tableau 11 : Effet de l'exposition au PFOA sur les concentrations d'acides aminés intracellulaires après 1 jour d'exposition. L'effet du PFOA a été testé, pour chaque métabolite (n=18), par une ANOVA à un facteur, suivi d'un test de Tukey (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001). Les flèches entre parenthèses indiquent le sens de variation observé du métabolite dans les cellules exposées au PFOA, par rapport aux cellules contrôle.

Métabolites	Effet du PFOA	DMSO vs 0,001 µM	DMSO vs 0,1 µM	DMSO vs 10 µM
Alanine	***	*** (↘)	*** (↘)	*** (↘)
Arginine	***	*** (↘)	*** (↘)	*** (↘)
Asparagine	*	* (↘)	* (↘)	ns
Aspartate	***	*** (↘)	*** (↘)	*** (↘)
Glutamate	***	*** (↘)	*** (↘)	*** (↘)
Glutamine	**	* (↘)	* (↘)	** (↘)
Glycine	***	*** (↘)	*** (↘)	*** (↘)
Histidine	***	** (↘)	** (↘)	*** (↘)
Isoleucine	***	*** (↘)	** (↘)	** (↘)
Leucine	***	*** (↘)	** (↘)	*** (↘)
Lysine	***	*** (↘)	*** (↘)	*** (↘)
Méthionine	***	*** (↘)	*** (↘)	*** (↘)
Phénylalanine	***	*** (↘)	*** (↘)	*** (↘)
Proline	***	*** (↘)	*** (↘)	*** (↘)
Serine	***	*** (↘)	*** (↘)	*** (↘)
Thréonine	***	*** (↘)	*** (↘)	*** (↘)
Tryptophane	***	*** (↘)	* (↘)	** (↘)
Tyrosine	***	*** (↘)	*** (↘)	*** (↘)
Valine	*	* (↘)	ns	* (↘)

Concernant les métabolites énergétiques, des différences significatives ont été observées pour une majorité d'entre eux (tableau 12). Au total, parmi les 30 métabolites énergétiques mesurés, 24 sont significativement affectés par l'exposition au PFOA. Comme pour les acides aminés, on observe, pour tous les composés significativement affectés par le PFOA, une diminution de la concentration ou de l'abondance relative des métabolites dans les cellules exposées au PFOA, par rapport aux cellules non exposées, et cela, pour chacune des 3 concentrations de PFOA. Pour la majorité de ces métabolites, cette diminution est observée quelle que soit la concentration de PFOA utilisée.

Les résultats concernant les classes de lipides sont représentés dans le tableau 13. Les résultats obtenus pour l'ensemble des espèces lipidiques sont détaillés en annexe 4. Parmi les 82 lipides mesurés, 47 sont significativement affectés par le PFOA. Pour certaines classes de lipides, telles que les TG et les PI, aucun des métabolites mesurés n'est significativement modulés par l'exposition au PFOA, quelle que soit la concentration d'exposition. Au contraire, l'ensemble des PE et le cholestérol semblent être affectés par le PFOA pour les trois différentes concentrations de PFOA. Certaines espèces parmi les classes de CER et de SM sont aussi modulées par l'exposition au PFOA.

Tableau 12 : Effet de l'exposition au PFOA sur les abondances des métabolites énergétiques intracellulaires après 1 jour d'exposition. L'effet du PFOA a été testé, pour chaque métabolite (n=18), par une ANOVA à un facteur suivi d'un test de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Les flèches entre parenthèses indiquent le sens de variation observé du métabolite dans les cellules exposées au PFOA, par rapport aux cellules contrôle.

Métabolites	Effet du PFOA	DMSO vs 0,001 μ M	DMSO vs 0,1 μ M	DMSO vs 10 μ M
2,3 bisphosphoglycérate	**	** (↘)	ns	ns
6 phosphogluconate	***	*** (↘)	** (↘)	ns
Alpha cétooglutarate	ns			
Adénosine monophosphate	*	ns	ns	* (↘)
Cytidine diphosphate	**	** (↘)	ns	* (↘)
Cytidine monophosphate	**	** (↘)	* (↘)	* (↘)
N Acétylglucosamine 1 phosphate	**	** (↘)	ns	** (↘)
N Acétylglucosamine 6 phosphate	**	* (↘)	** (↘)	** (↘)
Fructose 6 phosphate	***	** (↘)	** (↘)	** (↘)
Fructose 1 phosphate	***	** (↘)	** (↘)	*** (↘)
Glucose 6 phosphate	***	*** (↘)	** (↘)	*** (↘)
Glucose 1 phosphate	ns			
Glycérol 3 Phosphate	**	* (↘)	* (↘)	** (↘)
Guanosine monophosphate	*	* (↘)	ns	* (↘)
Pyridoxal 5 phosphate	ns			
Phosphoénolpyruvate	***	*** (↘)	** (↘)	* (↘)
Uridine diphosphate	ns			
Adénosine diphosphate	*	ns	ns	* (↘)
Adénosine triphosphate	ns			
Cytidine triphosphate	*	* (↘)	ns	ns
Phosphosérine	***	*** (↘)	* (↘)	ns

Tableau 12 (suite) :

Métabolites	Effet du PFOA	DMSO vs 0,001 µM	DMSO vs 0,1 µM	DMSO vs 10 µM
Sédoheptulose 7 phosphate	**	** (↘)	** (↘)	* (↘)
Uridine diphosphate N-acétylglucosamine	***	*** (↘)	ns	* (↘)
Uridine diphosphate glucose	***	*** (↘)	** (↘)	** (↘)
Uridine monophosphate	***	*** (↘)	* (↘)	** (↘)
Uridine triphosphate	*	* (↘)	ns	ns
Guanosine diphosphate	ns			
Malate	**	** (↘)	ns	* (↘)
Citrate	**	** (↘)	ns	* (↘)
Mannose 6 phosphate	***	*** (↘)	** (↘)	** (↘)

Tableau 13 : Effets du PFOA sur les différentes classes de lipides intracellulaires après 1 jour d'exposition. L'effet du PFOA a été testé, pour chaque classe de lipides (somme des espèces lipidiques) ($n=18$), par une ANOVA à un facteur suivi d'un test de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Les flèches entre parenthèses indiquent le sens de variation observé du métabolite dans les cellules exposées au PFOA par rapport aux cellules contrôle. Triglycérides (TG), céramides (CER), phosphatidyléthanolamine (PE), sphingomyélines (SM), phosphatidylinositols (PI), phosphatidylcholines (PC).

Classes	Effet du PFOA	DMSO vs 0,001 µM	DMSO vs 0,1 µM	DMSO vs 10 µM
Total CER	ns			
Total PC	*	ns	*	*
Total PE	***	***	**	***
Total SM	ns			
Total PI	ns			
Total TG	ns			
Cholestérol	***	***	**	**

Cependant, les analyses statistiques réalisées sur ces classes de lipides (somme des espèces lipidiques) ne semblent pas démontrer de différences significatives avec le contrôle négatif. Plus spécifiquement, pour les SM et CER, on observe principalement une diminution des espèces à plus courtes chaînes qui semblent notamment modulées par une exposition aux plus fortes concentrations de PFOA. Pour les PC, on observe une diminution de presque toutes les espèces mesurées, à l'exception de quelques PC à chaîne plus courte, mais uniquement aux 2 concentrations de PFOA les plus élevées. Globalement, nous avons mis en évidence la diminution d'une grande majorité des métabolites polaires et des lipides ciblés après 1 jour d'exposition, et ce pour les 3 concentrations de PFOA testées. Parmi tous les métabolites significatifs, le cholestérol, le glucose et l'alanine ont été représentés sur la figure 33. Les variations observées pour ces métabolites en réponse à l'exposition au PFOA sont représentatives des effets observés sur l'ensemble des métabolites lors de cette étude.

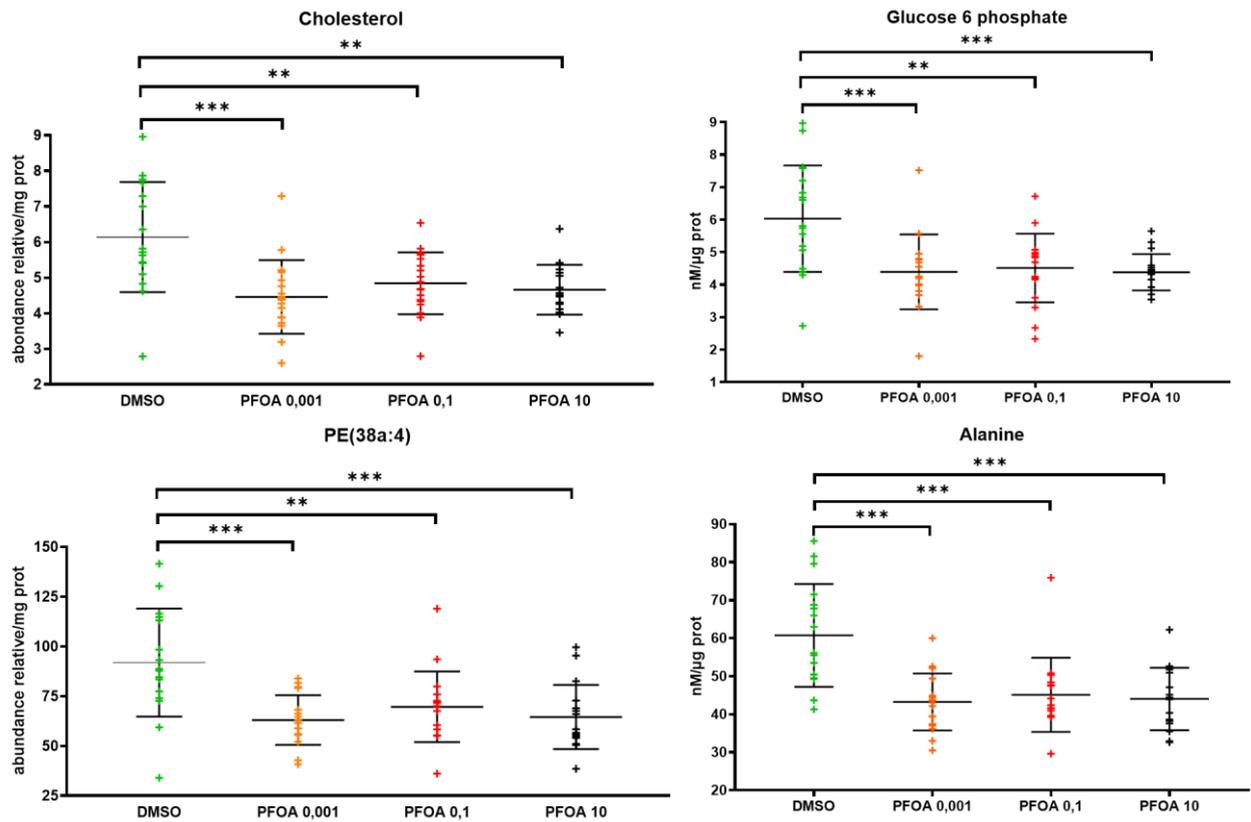


Figure 33 : Effet du PFOA sur les concentrations ou les abondances relatives obtenues pour le cholestérol, le glucose 6 phosphate, la phosphoéthanolamine (PE) (38a :4) et l'alanine après 1 jours d'exposition sur les cellules HepaRG. Les comparaisons 2 à 2 des concentrations d'exposition ont été réalisées avec un test post-hoc de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$), après une ANOVA à 1 facteur.**

Après 28 jours d'exposition au PFOA, contrairement aux observations réalisées après 1 jour d'exposition, très peu de différences significatives ont été observées pour les métabolites polaires et les lipides. Aucun effet n'a été observé pour l'ensemble des PI, PC, SM, CER, TG, ainsi que pour la majorité des acides aminés et des métabolites énergétiques. Seules des différences significatives ont été obtenues pour l'aspartate, l'alpha cétoglutarate, le malate, le citrate et le fumarate, à la plus forte concentration d'exposition au PFOA (10 μ M) où l'on observe une augmentation de ces métabolites. Concernant les lipides, uniquement le PE (32a:2) apparaît significativement impacté par le PFOA, là aussi uniquement pour la plus forte concentration, avec une augmentation de son abondance relative. L'ensemble des effets observés sur les métabolites polaires et les lipides mesurés lors de cette étude est résumé en Annexe 5. Les métabolites et lipides pour lesquels un effet significatif du PFOA a été mis en évidence après 28 jours d'exposition sont représentés dans la figure 34.

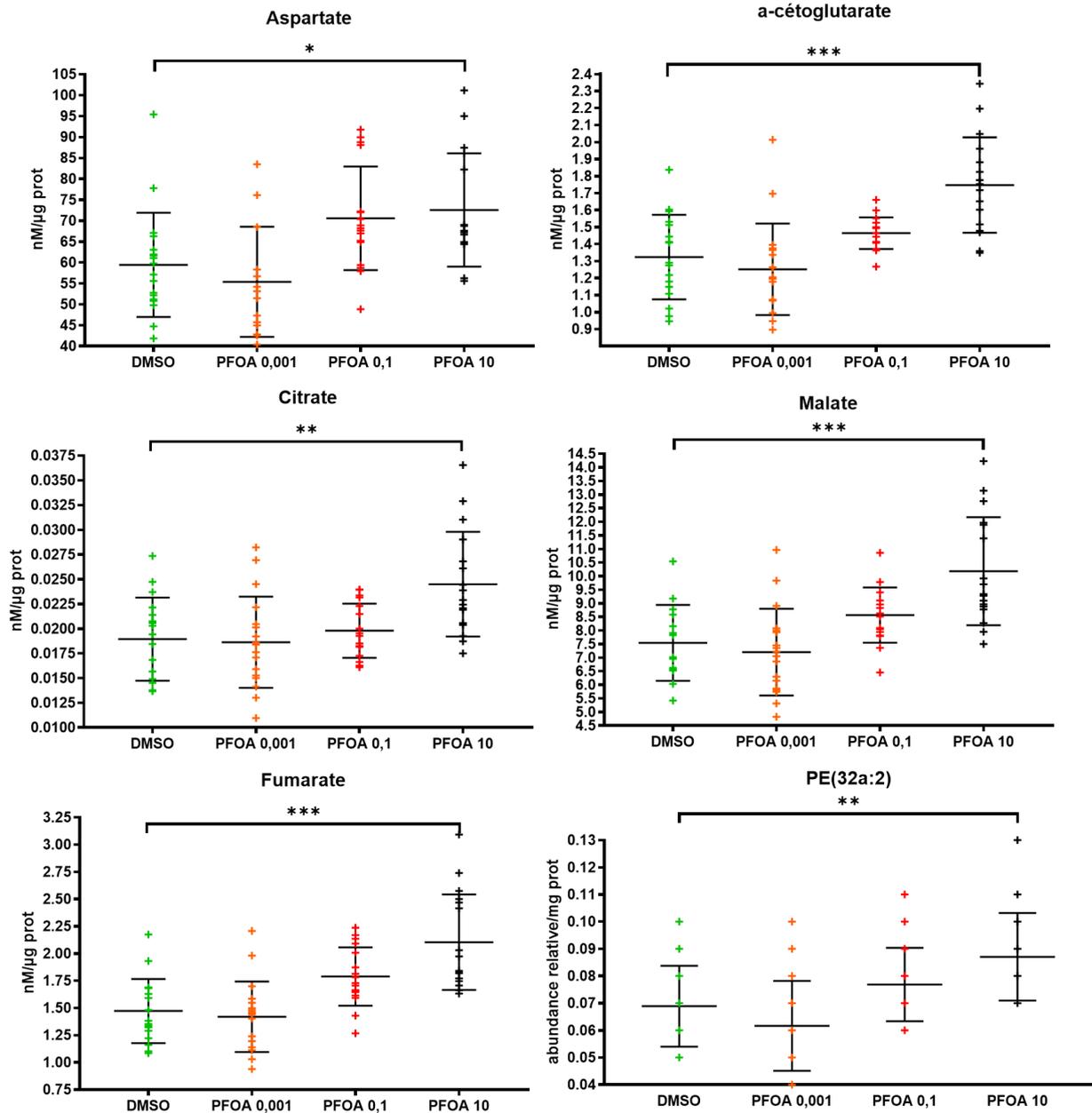
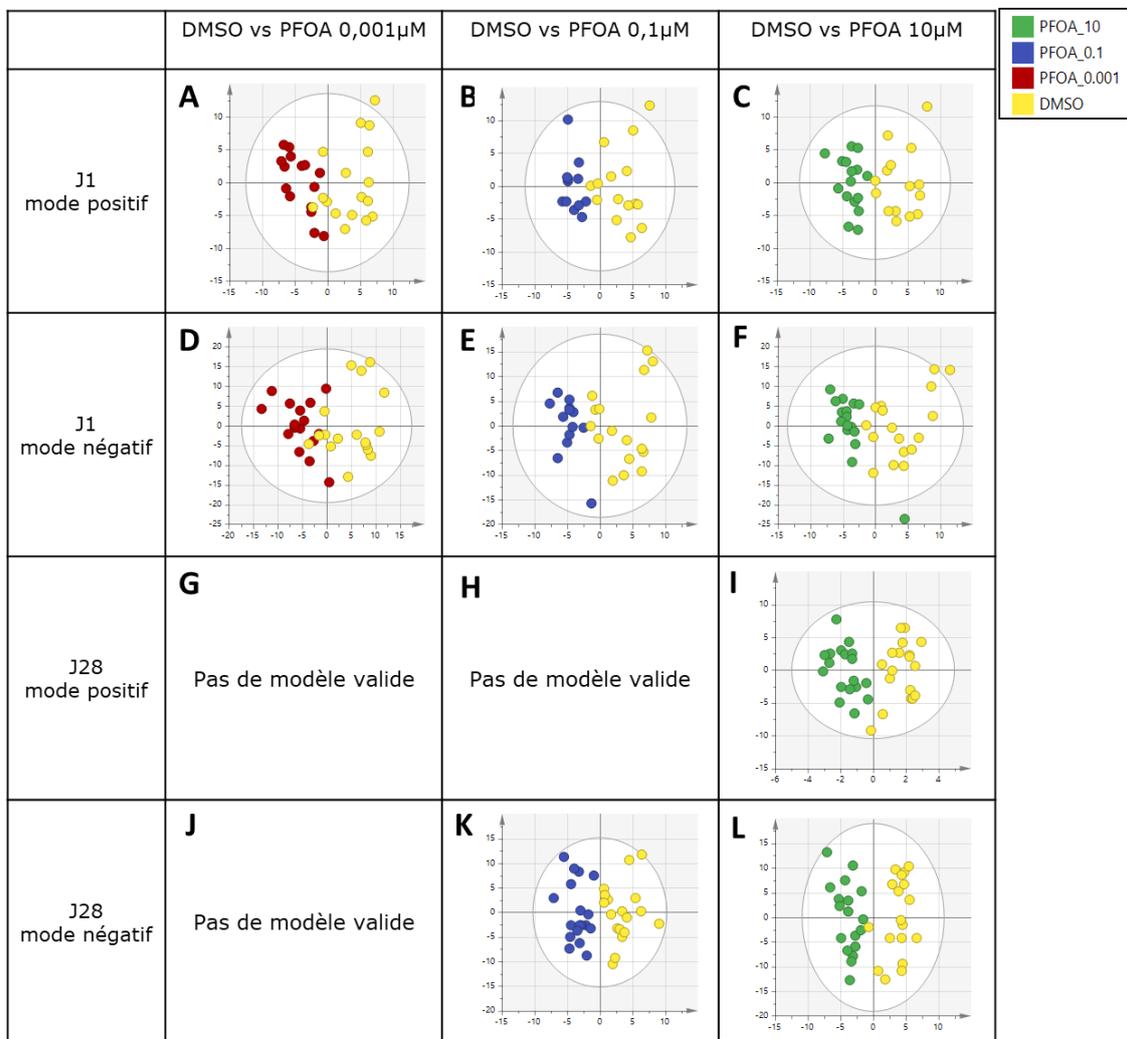


Figure 34 : Effet du PFOA sur les concentrations ou les abondances relatives mesurées pour l'aspartate, l'a-cétaglutarate, le citrate, le malate, le fumarate et le (PE) phosphoétanolamine (32a :2) après 28 jours d'exposition sur les cellules HepaRG. Une ANOVA à une facteur, suivie d'un test de Tukey, a été réalisée pour chaque métabolite (n=18) (* p < 0,05; ** p < 0,01; * p < 0,001).**

b. Analyses métabolomiques non ciblées

A la suite des étapes de filtration des données, 419 et 858 variables ont été obtenues pour les analyses non ciblées après 1 jour d'exposition au PFOA pour les modes positif et négatif, respectivement. Pour les analyses non ciblées réalisées après 28 jours d'exposition au PFOA, 287 et 1329 variables ont été obtenues pour les modes positif et négatif, respectivement.

Des analyses en composantes principales (ACP) ont tout d'abord été réalisées pour chaque temps d'exposition, pour l'ensemble des concentrations d'exposition en PFOA (cf. annexe 4). Aucune séparation nette entre les cellules exposées et non exposées aux différentes concentrations n'a pu être mise en évidence. Afin de comparer chaque concentration d'exposition à la condition contrôle, nous avons réalisé des OPLS-DA. Ces analyses permettent dans un premier temps d'identifier et de supprimer la variabilité orthogonale à notre facteur d'intérêt dans le jeu de données, c'est-à-dire la variabilité qui n'est pas liée au PFOA. Globalement, nous avons observé que le pourcentage de variabilité enlevé dans ces OPLS-DA correspond au pourcentage de variance expliquée par l'axe 1 des ACP, ce qui suggère que la variabilité principale contenue dans le jeu de données n'est pas liée à l'exposition au PFOA et peut potentiellement masquer l'effet de celle-ci, d'où l'intérêt de réaliser ce type d'analyse discriminante. Les scores plots obtenus pour l'ensemble des OPLS-DA réalisées ont été représentés dans la figure 35. Des modèles valides ont été obtenus pour chacune des 3 concentrations en PFOA après 1 jour d'exposition en modes positif et négatif, signifiant qu'il existe des différences significatives du métabolome entre les cellules exposées au PFOA et non exposées. Pour 28 jours d'exposition, des modèles valides ont été obtenus pour la plus forte concentration (10 μM) pour les modes d'ionisation positif et négatif, ainsi que pour la concentration intermédiaire utilisée (0,1 μM), et ce pour le mode négatif uniquement.



	Nombre de composantes (prédictive + orthogonale)	% de la variabilité orthogonale enlevé	Q ²	R ² origine (test de permutation)	Q ² origine (test de permutation)
A	1+1	18,8	0,458	0,639	-0,318
B	1+0	0	0,377	0,425	-0,25
C	1+0	0	0,414	0,393	-0,261
D	1+1	24,4	0,424	0,503	-0,473
E	1+1	23,1	0,422	0,558	-0,51
F	1+1	26,7	0,374	0,518	-0,411
G					
H					
I	1+2	41	0,38	0,642	-0,539
J					
K	1+1	12,7	0,383	0,565	-0,335
L	1+1	20,1	0,703	0,556	-0,387

Figure 35 : Score plots issus des analyses OPLS-DA réalisées sur les données de métabolomique non ciblée pour la comparaison des cellules non exposées (DMSO) et les cellules exposées aux différentes concentrations en PFOA. L'ensemble des paramètres obtenus pour chaque OPLS-DA est résumé dans le tableau.

Pour chaque OPLS-DA, nous avons identifié les variables discriminantes, c'est-à-dire contribuant le plus à expliquer la séparation entre les cellules exposées et non exposées (Tableau 14). Les résultats obtenus semblent confirmer que des modulations sont observées après 24 heures d'exposition, où plus de 100 variables sont significativement modifiées dans chaque condition par rapport au contrôle négatif. De plus, 154 variables semblent aussi être significativement modulées par la plus forte concentration en PFOA après 28 jours d'exposition en mode négatif. Seuls 4 métabolites appartenant au cycle de Krebs sont significativement impactés par le PFOA lors des analyses ciblées de ces chromatogrammes. Ces résultats suggèrent donc la possibilité que d'autres métabolites, qui n'ont pas été initialement ciblés dans ce travail sont affectés par le PFOA. Un métabolite peut cependant générer de nombreuses variables différentes lors d'une analyse non ciblée en fonction de son ionisation ou de la présence d'un adduit (H^+ , Na^+ , K^+ , etc.). Il est donc aussi possible que les variables discriminantes soient en réalité les mêmes métabolites mis en évidence lors des analyses ciblées.

Plus généralement, les résultats obtenus lors de cette étude semblent mettre en évidence un effet significatif du PFOA après 24h d'exposition pour de faibles concentrations d'exposition, alors que cet effet semble largement moins important après 28 jours d'exposition. Globalement, après 1 jour d'exposition, la plupart des métabolites mesurés dans les analyses ciblées semblent être modulés par le PFOA, c'est-à-dire les acides aminés, les métabolites impliqués dans les principales voies du métabolisme énergétique cellulaire (la glycolyse, le cycle de Krebs, la voie des pentoses phosphate, les voies de biosynthèses des nucléotides), les phospholipides et le cholestérol. Ces résultats indiquent que le PFOA est capable de fortement moduler le métabolisme hépatique lors d'une exposition ponctuelle et à de faibles concentrations, supposées suffisamment représentatives de l'exposition humaine à ce composé.

Tableau 14 : Nombre de variables discriminantes significatives obtenues pour chaque modèle OPLS-DA valide sur l'ensemble des conditions. Les variables sont considérées significatives si elles sont une VIP >1 et que la différence est significative entre les 2 groupes (*p*-value < 0,05 sur le test Student, après correction par FDR).

Durée d'exposition	Mode d'ionisation	Concentration d'exposition (comparaison par rapport au DMSO)	Score plot de la figure 35	Nombre de variables discriminantes
J1	Mode positif	0,001 µM PFOA	A	95
J1	Mode positif	0,1 µM PFOA	B	152
J1	Mode positif	10 µM PFOA	C	187
J1	Mode négatif	0,001 µM PFOA	D	240
J1	Mode négatif	0,1 µM PFOA	E	141
J1	Mode négatif	10 µM PFOA	F	240
J28	Mode positif	10 µM PFOA	I	20
J28	Mode négatif	0,1 µM PFOA	K	8
J28	Mode négatif	10 µM PFOA	L	154

En parallèle, nous avons aussi observé un effet significatif de l'exposition au PFOA sur la quantité de protéines mesurées après 1 jour d'exposition, cette quantité étant augmentée pour les 3 concentrations de PFOA utilisées dans cette étude. Cette augmentation de la quantité de protéines n'a pas été observée après 28 jours d'exposition au PFOA. Ces observations suggèrent que le PFOA pourrait induire une augmentation de la prolifération cellulaire ou de la synthèse protéique. Une étude, publiée en 2018, a également démontré que le PFOA stimulait la prolifération cellulaire pour des concentrations entre 50 et 100 μM après 48 et 72 heures d'exposition dans la lignée MCF-10A, qui est une lignée cellulaire épithéliale mammaire humaine (Pierozan et al. 2018). Aucune publication ne semble indiquer un effet du PFOA sur la synthèse protéique intracellulaire. Dans notre étude, les concentrations et les abondances relatives obtenues ont été normalisées par la quantité de protéines. La quantité de protéines est utilisée comme une estimation de la quantité de cellules, et cette normalisation, qui est classique, permet donc généralement de corriger la quantité de cellules réelles qui peut être variable en fonction des puits (Misra 2020). Dans cette étude, nous avons également observé une différence significative de la quantité de protéines entre les 3 batchs et notamment dans le batch 3, où elle est significativement plus importante, suggérant potentiellement une quantité de cellules plus importante introduite à l'ensemencement. La normalisation est donc nécessaire car elle permet ici de corriger cet effet batch. Néanmoins, si le PFOA affecte la synthèse protéique sans pour autant affecter la quantité de cellules dans chaque puits, la normalisation pourrait expliquer en partie les diminutions des concentrations et des abondances relatives observées pour un grand nombre de métabolites, sans que cela ne soit un effet direct du PFOA sur le métabolome. Cependant, les effets majeurs observés après 1 jour d'exposition peuvent également être le résultat d'un fort stress des cellules lié à l'exposition ponctuelle au PFOA, qui impacterait à la fois la prolifération cellulaire (ou la synthèse protéique) et le métabolome.

Une étude publiée en 2020, a mis en évidence une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol et de la glycolyse, ainsi qu'une augmentation des gènes impliqués dans le transport transmembranaire des acides aminés, sur des cellules HepaRG exposées à une forte concentration en PFOA (100 μ M), même si celles-ci est supérieure à celles utilisées dans notre étude (Louisse et al. 2020). Ces observations sont en accord avec les effets mis en évidence dans notre étude après 1 jour d'exposition au PFOA. La diminution des acides aminés libres dans les cellules pourrait s'expliquer par une augmentation de leur utilisation dans la synthèse protéique. De manière générale, peu de données sont disponibles dans la littérature concernant les effets du PFOA sur le métabolome intracellulaire. A l'inverse, davantage d'études, mais *in vivo*, ont rapporté des modifications du lipidome en lien avec l'exposition au PFOA, souvent au niveau plasmatique. Par exemple, plusieurs études ont démontré une augmentation des taux de LDL cholestérol et du cholestérol total dans le plasma chez l'Homme pour les travailleurs et résidents exposés au PFOA (Costa et al. 2009; Nelson et al. 2010; Eriksen et al. 2013; Fitz-Simon et al. 2013). Timmermann et ses collaborateurs ont aussi montré une association positive entre les taux de triglycérides plasmatiques et les concentrations plasmatiques en PFOA (Timmermann et al. 2014). Cependant, il est difficile d'établir un lien direct entre des modulations ayant lieu au niveau plasmatique et au niveau hépatique. Concernant le cholestérol, aucun effet significatif n'a été mis en évidence au niveau hépatique dans le modèle HepaRG lors d'une étude utilisant des concentrations de PFOA supérieures à l'exposition humaine (25 à 200 μ M) (Louisse et al. 2020).

Pour les PC, des effets similaires à ceux mis en évidence dans cette étude ont également été rapportés dans la littérature. Yu et ses collaborateurs ont montré une diminution de l'abondance relative de plusieurs PC sur des souris fortement exposées au PFOA au niveau hépatique (0,5 à 2,5mg PFOA/kg/jour) (Yu et al. 2016). A l'inverse, une augmentation des PC a été

mise en évidence dans le modèle HepaRG après 72 heures d'exposition au PFOA (1 à 1000 nM) (Franco et al. 2020), ce qui est contradictoire avec nos observations après 24 heures d'exposition.

A propos des PE, une étude chez l'Homme a montré une association positive entre les taux des PFOA plasmatique et les niveaux plasmatiques des PE chez des adolescents atteints de stéatose hépatique non alcoolique (Jin et al. 2020). De plus, l'activité d'enzymes clés liées au métabolisme des PE semblent être significativement réduite par une exposition au PFOA chez le rat au niveau hépatique (Kudo et al. 1999), ce qui pourrait expliquer la diminution de la teneur hépatique en PE observés dans notre étude. Aucun effet significatif du PFOA dans le foie sur la classe des SM et les CER n'a été mis en évidence dans la littérature à des concentrations comparables à notre étude (Franco et al. 2020), ce qui est en accord avec nos observations.

Pour les TG, de nombreuses études montrent une accumulation des TG au niveau hépatique chez les animaux (rongeurs) et sur modèle hépatique humain (Kudo et al. 1999; Yu et al. 2016; Louisse et al. 2020) après une exposition à de fortes concentrations de PFOA (supérieures à 100 μM *in vitro* et au-delà de 0.5 mg/ml/jour *in vivo*). Une augmentation des TG a aussi été observée sur le modèle HepaRG à de faibles concentrations (1 nM) après 72 h d'exposition au PFOA (Franco et al. 2020), ce qui est contradictoire avec nos observations. Nous avons ciblé seulement 6 TG dans cette étude et notamment des TG à chaînes longues (>50 carbones). Il est possible que le PFOA affecte des TG à chaînes plus courtes uniquement comme ce qui a été mesuré dans cette dernière publication (Franco et al. 2020).

Les résultats obtenus dans cette étude suggèrent qu'après 28 jours d'exposition, les effets du PFOA sur les métabolites ciblés sont moins importants que suite à une exposition de 24 heures. Seuls les métabolites participant au cycle de Krebs ont des niveaux significativement plus élevés

après une exposition à 10 μM de PFOA. Ces résultats suggèrent donc que le PFOA pourrait affecter certaines voies du métabolisme énergétique cellulaire pour des concentrations relativement élevées (10 μM). Le cycle de Krebs est une voie métabolique ayant lieu dans les mitochondries. Son fonctionnement dépend de la génération d'acétyl-CoA pouvant provenir de la dégradation des polyosides (glycolyse, voie des pentoses phosphates), des lipides (β -oxydation) et des acides aminés. Le cycle de Krebs permet de générer de l'énergie pour la cellule par la production de molécules d'ATP fournissant l'énergie nécessaire aux réactions chimiques du métabolisme endogène (Alabduladhem and Bordoni 2020). Cependant, la concentration d'ATP dans les cellules HepaRG ne semble pas être affectée par le PFOA après 28 jours d'exposition lors de cette étude, il est donc probable que d'autres mécanismes soient impliqués pour réguler cette quantité d'ATP dans la cellule. Nous avons également observé une augmentation de la quantité d'aspartate après 28 jours d'exposition au PFOA : cet acide aminé semble aussi lié au cycle de Krebs et son augmentation a été associée à un flux élevé du cycle de Krebs allant de l' α -cétoglutarate jusqu'à oxaloacétate (Nissen et al. 2015), ce qui est cohérent avec nos observations. Les différences observées entre les deux temps d'exposition pourraient s'expliquer par un phénomène d'adaptation du modèle au cours du temps face à un stress. En effet, les modèles biologiques comme le modèle HepaRG sont très complexes et la régulation du métabolisme endogène passe par de multiples mécanismes liés les uns avec les autres (Arense et al. 2010). Ainsi, d'autres voies métaboliques peuvent prendre le relai pour maintenir le bon fonctionnement des cellules.

Les résultats obtenus par les approches de métabolomique non ciblée semblent confirmer un effet du PFOA au niveau hépatique après 1 jour d'exposition, où l'on observe une discrimination significative entre les cellules exposées et non exposées pour chacune des 3 concentrations en PFOA, ce qui suggère une modification du métabolome dû à l'exposition au PFOA. Ceci confirme les observations obtenues en métabolomique ciblée

sur ces mêmes spectres. L'identification des métabolites correspondants aux variables discriminantes mises en évidence dans les analyses OPLS-DA pourrait permettre de trouver d'autres métabolites impactés par le PFOA et qui n'auraient pas été analysés lors des analyses ciblées. Cependant, cela requiert une identification confirmée par l'utilisation de standards car en métabolomique non ciblée un métabolite peut s'ioniser de plusieurs façons différentes et ainsi générer de nombreuses variables.

Les résultats obtenus après 28 jours d'exposition sont aussi cohérents avec les effets observés en métabolomique ciblée, avec notamment une absence d'effet du PFOA pour les 2 plus faibles concentrations (0,001 et 0,1 μM). Les résultats obtenus en métabolomique ciblée ont montré que seulement 1 acide aminé (l'aspartate) et 4 métabolites appartenant au cycle de Krebs (malate, citrate, fumarate et α -cétoglutarate) étaient significativement impactés par le PFOA à la plus forte concentration (10 μM) en mode positif et négatif respectivement. Les analyses statistiques univariées ont montré que 20 et 154 variables sont significativement affectées par le PFOA (10 μM) en mode positif et négatif respectivement. Au vu du grand nombre de variables impactées par le PFOA, il est fort probable que d'autres métabolites issus d'autres voies métaboliques, et qui n'ont pas été observés en métabolomique ciblée, soient aussi impactés. Par exemple, plusieurs études ont montré une altération des carnitines et acylcarnitines par le PFOA *in vitro*, sur un modèle hépatique humain, et *in vivo*, chez la souris (Tan et al. 2013; Peng et al. 2013; Yu et al. 2016). Cette famille de molécules intervient dans le transport des acides gras du cytosol vers les mitochondries. Elles sont essentielles pour le métabolisme des lipides et sont principalement impliquées dans la β -oxydation des acides gras (Longo et al. 2016). La β -oxydation est la principale voie métabolique de dégradation des molécules d'acides gras pour produire de l'acétyl-CoA, dont le groupe acétyle est oxydé par le cycle de Krebs et du NADH et du FADH₂, dont les électrons à haut potentiel alimentent la chaîne respiratoire (Schroeder et al. 2012). Ces effets démontrés dans la littérature seraient

en lien avec les effets observés sur les métabolites du cycle de Krebs lors de notre étude. Cependant, il est nécessaire d'identifier ces métabolites pour pouvoir conclure, ce long travail d'identification n'a pas encore été réalisé.

4.5.4 Conclusion

Dans cette étude, la métabolomique a permis de mettre en évidence des effets du PFOA sur un modèle hépatique humain (HepaRG), pour des concentrations susceptibles de correspondre à différents scénarios d'exposition humaine. Ces effets semblent particulièrement prononcés après une exposition ponctuelle de 1 jour au PFOA, où ce composé semble moduler le métabolisme de manière globale, c'est-à-dire le métabolisme des acides aminés, des PE, PC, ainsi que de nombreux métabolites participant aux voies principales du métabolisme énergétique cellulaire. Cependant, il est possible que ces effets observés soient biaisés par l'effet du PFOA sur la quantité de protéine dans les cellules. Ce qui ne nous permet pas de conclure clairement sur les effets du PFOA après 24 heures d'exposition. Après 28 jours d'exposition, beaucoup moins de modulations des métabolites ont été observées en métabolomique ciblée suggérant un phénomène d'adaptation des cellules au cours du temps. Cependant, certains métabolites semblent significativement augmentés dans les cellules HepaRG suite à une exposition longue au PFOA et pour une concentration relativement élevée (10 μ M), particulièrement les métabolites participant au cycle de Krebs. Les analyses non ciblées réalisées confirment l'impact du PFOA sur notre modèle hépatique après 1 jour d'exposition. Après 28 jours d'exposition, ces analyses non ciblées suggèrent aussi que le PFOA peut impacter d'autres voies métaboliques qui n'ont pas été ciblées lors des analyses ciblées. L'identification des variables affectées par le PFOA doit encore être réalisée pour tirer des conclusions sur les autres voies métaboliques affectées par le PFOA.

5. Discussion générale, conclusions et perspectives

L'objectif de ce projet de thèse était d'explorer les voies métaboliques hépatiques altérées lors d'une exposition à différentes concentrations de PFOA, sur un modèle cellulaire hépatique humain (HepaRG), dans le but de mieux caractériser et comprendre les effets de ce composé chez l'Homme. Plus largement, l'étude des modulations métaboliques induites par des composés tels que le PFOA, fortement suspectés d'être des perturbateurs endocriniens et métaboliques, doit pouvoir être réalisée à de faibles concentrations, c'est-à-dire à des concentrations cohérentes avec les concentrations d'exposition estimées pour la population générale. Les effets attendus pour ce type de substances (qui relèvent d'une modulation du métabolisme) sont par définition complexes à mettre en évidence. L'émergence des approches omiques, et leur application à des modèles *in vitro* suffisamment représentatifs des événements prenant place au sein d'un tissu suite à l'exposition chimique, constitue une opportunité et une nécessité pour la recherche en toxicologie. De fait, la translation est fortement engagée vers des modèles compatibles avec l'éthique animal, et il est indispensable également de développer des systèmes d'essai permettant d'évaluer la dangerosité des nombreuses substances chimiques présentes dans notre environnement. Néanmoins, les approches métabolomiques appliquées à la toxicologie cellulaire n'en sont qu'à leurs débuts. Au-delà du choix du modèle cellulaire, son utilisation en toxicologie nécessite de prendre en compte plusieurs difficultés. D'une part, il est important de pouvoir prendre en compte l'une des caractéristiques de la métabolomique, à savoir sa forte sensibilité à l'ensemble des facteurs exogènes et endogènes, qui est susceptible d'engendrer une variabilité importante pouvant masquer l'effet biologique d'un composé d'intérêt. D'autre part, les effets d'une substance chimique d'intérêt peuvent affecter de nombreuses voies métaboliques. C'est pourquoi, une vue la plus exhaustive possible du métabolome est nécessaire.

Pour toutes ces raisons, au-delà de l'examen du cas spécifique du PFOA, ce travail de thèse s'est centré sur le développement des approches de métabolomique cellulaire, en prenant en compte et en essayant de lever les principaux verrous existants dans ce domaine. Des développements méthodologiques ont été réalisés dans un premier temps afin d'adapter les protocoles de culture cellulaire et de métabolomique pour améliorer la mise en évidence des effets métaboliques globaux. Le travail a été centré sur des points clés de l'étape de préparation des échantillons en évaluant leurs conséquences sur les résultats de métabolomique. De plus, étant donné que les contaminants alimentaires tels que le PFOA sont suspectés d'affecter de nombreuses voies métaboliques, un protocole permettant d'augmenter la couverture du métabolome pour un même échantillon a été développé pour maximiser les chances d'observer des modulations induites par ce type de composé.

5.1 Amélioration des protocoles pour limiter la variabilité dans les études métabolomiques

Les métabolites sont les produits finaux de tous les processus de régulation biochimique et métabolique d'un organisme. Leur variations de niveau peuvent être utilisés comme des indicateurs reflétant la réponse ultime des systèmes biologiques aux changements génétiques ou environnementaux (Fiehn 2002). La métabolomique est une technologie capable d'observer avec une grande sensibilité analytique, les modulations induites sur le métabolome dans une condition d'intérêt. Cette forte sensibilité analytique implique aussi l'apparition de sources de variabilité liées à de nombreux facteurs comme par exemple la température, le stress cellulaire, le cycle cellulaire, et ce en plus du facteur biologique étudié. Par conséquent, il est important de limiter ces sources de variabilité pour pouvoir mettre en évidence celle spécifiquement liée au facteur biologique d'intérêt, car tout facteur de variabilité supplémentaire peut contribuer à masquer l'effet biologique recherché. Dans cette optique, nous avons choisi d'étudier plus spécifiquement plusieurs points clés du workflow de métabolomique qui nous sont apparus particulièrement problématiques par rapport à la variabilité expérimentale.

5.1.1 Importance d'un arrêt rapide du métabolisme cellulaire

Afin d'étudier l'impact d'un composé sur le métabolome cellulaire, il est nécessaire d'obtenir des mesures des métabolites qui reflètent le plus possible l'état physiologique de la cellule au moment de l'expérimentation. Pour cela, il serait idéal de pouvoir extraire les métabolites provenant des cellules instantanément à la fin de l'expérience afin d'éviter toute dégradation ou modification ultérieure pouvant générer de la variabilité. En pratique, il est impossible d'éliminer totalement cette source de variabilité, car il est impossible d'arrêter instantanément le métabolisme cellulaire et le métabolisme de l'ensemble des répliquas d'une expérience en même temps. Cependant, il est possible de rechercher les conditions et modes

opératoires permettant de considérablement la limiter. Lors de ce travail de thèse, deux protocoles d'arrêt du métabolisme cellulaire ont été comparés : le protocole de fast-quenching développé par Martano et ses collaborateurs qui a été adapté lors de ce travail de thèse pour convenir aux différentes analyses réalisées (Martano et al. 2015), ainsi qu'un protocole « standard » plus simple, représentatif de ceux classiquement utilisés en métabolomique. Nous avons montré que le protocole de fast-quenching peut fortement améliorer la qualité des résultats obtenus, notamment en améliorant l'étape de lavage des cellules (séparation entre les métabolites intracellulaires et les métabolites issus du milieu extracellulaire) et en accélérant la vitesse d'exécution du protocole, ce qui permet de limiter la variabilité dans les données obtenues. Cependant, des solutions différentes (mélanges de solvants différents) ont été utilisées dans les deux cas pour l'arrêt du métabolisme, ce qui complique l'interprétation des résultats et ne nous permet pas de déterminer clairement si la baisse de variabilité observée provient du protocole lui-même ou du différentiel dans les solvants utilisés. Pour conclure sur les réels bénéfices de ce protocole, une expérience supplémentaire devra être réalisée en utilisant exactement les mêmes mélanges de solvants. En l'état, nos résultats suggèrent toutefois fortement que la baisse de variabilité observée avec le protocole de fast-quenching provient de sa rapidité d'exécution. En particulier, nous avons observé une meilleure reproductibilité des concentrations mesurées pour les métabolites énergétiques phosphorylés (ATP, AMP, CTP, UMP, UDP, GPDman, etc.). Dans la littérature, il avait déjà été démontré que de nombreux métabolites énergétiques comme l'ATP sont très rapidement modifiés par les processus enzymatiques dans les cellules (Dietmair et al. 2010; Vijay Kapoore et al. 2017). De plus, une étude a aussi montré que la rapidité d'exécution du processus d'arrêt du métabolisme cellulaire permet de considérablement améliorer les taux de récupération de ces composés phosphorylés. Cette étude conclut notamment à une amélioration du blocage des conversions métaboliques enzymatiques dans les cellules

(Hernández Bort et al. 2014). Bien que la technique d'arrêt du métabolisme utilisée dans cette étude soit différente, le temps pour stopper le métabolisme des cellules était similaire (15 à 20 secondes), ce qui peut confirmer l'hypothèse que la vitesse d'arrêt du métabolisme cellulaire est importante, notamment pour la mesure de certaines classes de métabolites.

5.1.2 Importance du choix des solvants pour la couverture du métabolome

Afin d'optimiser la couverture du métabolome et d'explorer les changements qui se produisent simultanément au niveau de différentes voies métaboliques, il est essentiel de pouvoir effectuer la mesure d'un grand nombre de métabolites sur un échantillon biologique donné, qui lui-même est souvent limité en termes de taille et/ou de volume. Idéalement, l'analyse du métabolome vise à extraire le plus grand nombre possible de métabolites, pour accéder, sinon à une couverture exhaustive du métabolome, au moins à une image de la composition des échantillons la plus proche possible de la réalité. Cependant, il n'existe pas de mélange de solvants « idéal », permettant d'extraire l'entièreté du métabolome en vue d'une analyse (Pinu et al. 2017). Il a été reporté dans la littérature l'utilisation de plusieurs solvants différents pour l'extraction des métabolites intracellulaires, comme par exemple le méthanol (Shryock et al. 1986), l'éthanol (Gonzalez et al. 1997), l'eau (Bolten et al. 2007), etc. Des travaux plus récents indiquent que la combinaison de solvants de polarités différentes est pertinente pour obtenir des profils globaux des métabolites intracellulaires, permettant d'aboutir à une meilleure interprétation biologique (Rabinowitz and Kimball 2007; Bi et al. 2013). Rabinowitz et ses collaborateurs ont notamment comparé plusieurs mélanges de solvants pour l'extraction du métabolome d'*Escherichia coli* et ont conclu que l'utilisation d'un mélange de solvants acidifiés permet de quantifier correctement les acides aminés et la majorité des métabolites liés au métabolisme énergétique. Ces composés font partie de ceux impliqués dans

les voies suspectées d'être affectées par le PFOA. L'étude a notamment conclut que le mélange de solvants méthanol/acétonitrile/eau acidifiée (40/40/20) diminue la dégradation des métabolites phosphorylés (Rabinowitz and Kimball 2007).

Dans ce travail de thèse, nous avons démontré qu'une plus grande quantité d'ions pouvait être observée lors des analyses non ciblées en SDM avec le mélange de solvants utilisé dans le protocole fast-quenching (acétonitrile/méthanol/eau acidifié (40/40/20)), comparé au mélange eau/acétonitrile (90/10) utilisé dans le protocole classique. Nos résultats indiquent que le mélange méthanol/acétonitrile/eau acidifié est très satisfaisant pour obtenir une bonne reproductibilité dans la mesure des métabolites d'intérêt, notamment les métabolites énergétiques ciblés dans ce travail de thèse. Ce mélange permet aussi de maximiser le nombre de métabolites extraits lors d'une analyse métabolomique non ciblée. Pour ces raisons, le mélange de solvants méthanol/acétonitrile/eau acidifié (40/40/20) a été sélectionné pour étudier les effets métaboliques du PFOA. Il pourrait être intéressant de réaliser un travail d'optimisation supplémentaire de ce mélange de solvants, en comparant plusieurs mélanges différents. En effet, ce travail ne semble pas avoir été réalisé spécifiquement pour le modèle HepaRG à ce jour. Par exemple, certaines classes de lipides comme les phosphatidylsérines ou les acides gras mono et polyinsaturés n'ont pas pu être correctement détectées lors de ce travail de thèse et peuvent néanmoins être intéressantes dans le cadre de l'étude des effets sur le métabolisme. L'utilisation d'un mélange de solvants légèrement plus apolaire pourrait permettre leur détection, mais il est cependant nécessaire de ne pas perdre la possibilité d'extraire puis de détecter des métabolites polaires, comme les acides aminés ou les métabolites énergétiques mesurés lors de ce travail. L'augmentation de la couverture du métabolome et du lipidome constitue de fait un défi lors d'une étude métabolomique, car elle nécessite la plupart du temps, de combiner différentes préparations d'échantillons et techniques d'analyses (Vuckovic

2018), ce qui est à la fois coûteux et long, mais aussi peut introduire de la variabilité en multipliant les manipulations. C'est pourquoi un protocole de double extraction permettant la mesure des métabolites polaires et des lipides sur un même échantillon a été développé au cours de cette thèse. Les résultats obtenus avec ce nouveau protocole nous ont permis d'obtenir un profilage quantitatif et qualitatif très satisfaisant pour de nombreux métabolites polaires et espèces lipidiques. Cela a aussi conduit à souligner la capacité de ce protocole à mettre en évidence des modulations pour plusieurs classes de métabolites de polarité très différentes sur le même échantillon. Par conséquent, ce protocole a été utilisé pour étudier les effets du PFOA sur de nombreux métabolites polaires et lipides suspectés d'être affectés par l'exposition à ce contaminant.

En conclusion, l'utilisation du protocole de fast-quenching, avec le mélange de solvants indiqué, combiné à une méthode de double-extraction, semble fournir de nombreux avantages notamment dans le cadre de l'étude des effets d'un contaminant alimentaire pouvant affecter de multiples voies métaboliques, comme c'est le cas pour le PFOA. Une des limites est cependant le nombre d'expérimentateurs requis pour sa réalisation. En effet, 5 à 6 personnes sont nécessaires alors qu'une seule peut suffire pour un protocole classique. Ce protocole requiert donc une organisation importante et une forte disponibilité en personnel. Néanmoins, l'utilisation du protocole de double extraction offre de nombreux avantages en termes de temps d'expérimentation et d'analyse, et il réduit les coûts générés par une expérimentation multi-omique. Il peut de plus être facilement appliqué à de nombreux modèles (échantillons plasmatiques, tissus, etc.) notamment lorsque la quantité d'échantillons biologiques est limitée. A terme, la combinaison de ces deux protocoles pourra donc être très utile dans le but d'explorer les modulations métaboliques, telles que celles soupçonnées pour d'autres contaminants alimentaires ou environnementaux.

5.1.3 Limitation de la variabilité par l'utilisation d'un même passage cellulaire

Lors d'une analyse métabolomique, une variabilité importante est souvent mise en évidence entre les répliques biologiques (Fernández-Albert et al. 2014; Herman et al. 2017). Pour des études utilisant un modèle cellulaire, les passages cellulaires ne sont souvent pas précisés dans les différentes publications. En pratique, la production des échantillons est souvent réalisée sur des passages cellulaires successifs. L'effet entre les répliques observés peut alors correspondre à la variabilité biologique entre les passages cellulaires, plutôt qu'à celui du composé étudié. Dans la bibliographie, l'effet du passage cellulaire sur le métabolome ne semble pas avoir été étudié (Cuperlović-Culf et al. 2010). L'influence du passage cellulaire a déjà été démontrée au niveau de l'expression des gènes et des protéines pour les cellules CACO-2 (lignée cellulaire colorectale humaine), SF9 (issues d'un insecte, *Spodoptera frugiperda*) et MIN-6 (cellules pancréatiques de souris) (Briske-Anderson et al. 1997; Calles et al. 2006; O'Driscoll et al. 2006). Dans ces études, il a été démontré que le passage cellulaire peut avoir une influence sur la morphologie ainsi que sur les activités de certaines enzymes ou sur le niveau d'expression de gènes dans un modèle cellulaire. Néanmoins, ces effets ont été démontrés sur des modèles cellulaires avec 50 à 100 passages cellulaires d'écart, ce qui est relativement élevé en comparaison de certains modèles cellulaires classiquement utilisés en toxicologie utilisés sur une dizaine de passage seulement. Concernant les cellules HepaRG, des niveaux comparables d'expression des cytochromes P450 et récepteurs nucléaires dans les cellules différenciées ont été observés sur différents passages, et ce jusqu'au 20^{ème} (Anthérieu et al. 2010; Adam et al. 2020). Nous avons exploré au cours de cette thèse l'hypothèse que le passage cellulaire peut être lié à une modification du métabolome d'une lignée cellulaire, et par conséquent être considéré comme un facteur de variabilité pour des données produites à partir de passages cellulaires différents.

Lors de nos travaux, nous avons montré une modification des niveaux de métabolites endogènes entre plusieurs passages cellulaires différents sur le modèle HepaRG (entre les passages 13 et 19). Nous avons observé ce type d'effet pour l'ensemble des métabolites ciblés, ainsi que lors des analyses non ciblées. Cet effet semble plus prononcé pour les passages cellulaires les plus élevés étudiés (P18 et P19). Il est plus que vraisemblable que cet effet, clairement démontré sur le modèle HepaRG lors de cette thèse, existe aussi pour toutes les lignées cellulaires. La prise en compte de cet effet pour des études *in vitro* est nécessaire afin d'améliorer la qualité des données obtenues lors d'une expérience de métabolomique. Aux vues de nos résultats, il semble donc nettement préférable, dans ce type d'étude, de générer l'ensemble des échantillons d'une même expérimentation sur un même passage cellulaire afin de limiter la variabilité. C'est le choix que nous avons fait pour la suite des travaux réalisés au cours de cette thèse, en travaillant sur le même passage cellulaire dans l'ensemble des expériences réalisées. Le passage 16 a été sélectionné pour les cellules HepaRG, afin de pouvoir générer suffisamment de cellules pour une expérience de métabolomique. A noter que ce choix, essentiellement guidé par nos résultats, conduisait aussi à nous rapprocher des conditions dans lesquelles les cellules HPR116 sont commercialisées (passage cellulaire 16), et donc dans les conditions où elles sont généralement utilisées, facilitant potentiellement de futures comparaisons avec d'autres expériences menées sur ce modèle cellulaire.

5.1.4 Perspectives

Lors de ces travaux, nous nous sommes focalisés sur un certain nombre de points nous paraissant particulièrement critiques dans l'introduction de variabilité en métabolomique. Cependant, il existe d'autres sources pouvant générer de la variabilité lors d'une étude métabolomique, et qui n'ont pas été abordées lors de cette thèse :

- Lors de la culture des cellules, l'ajout de sérum de veau fœtal (SVF) dans les milieux de culture est indispensable, notamment lors

d'études à long terme. Les principales fonctions du SVF sont de fournir des facteurs de croissance pour la prolifération des cellules, ainsi que des nutriments essentiels comme des lipides, qui ne sont pas présents dans les milieux extracellulaires (Fang et al. 2017). En revanche, la composition du SVF peut aussi être une source de variabilité en culture cellulaire, dans la mesure où la concentration des nutriments et des facteurs de croissance peut varier entre les lots de sérum (Gstraunthaler 2003). Ces variations peuvent affecter le phénotype des cellules en culture ainsi que leur prolifération, ce qui implique des résultats différents lors d'une étude métabolomique (Cuperlović-Culf et al. 2010). Une étude récente a exploré les changements des profils métaboliques de cellules cultivées dans un milieu enrichi en sérum, réduit en sérum, sans sérum ou dans des substituts de sérum. Elle a montré que la supplémentation du milieu de culture cellulaire avec du sérum peut influencer le métabolisme endogène des cellules (Hartmann et al. 2008). Lors de cette thèse, afin de limiter cette variation, l'ensemble des expériences a été réalisé avec un même lot de sérum. Cependant, par définition, n'importe quel lot de sérum finit par s'épuiser, ce qui implique une possible modification du phénotype cellulaire et complique les comparaisons avec les expériences ultérieures. Une des solutions futures pour limiter ces variations est le développement de milieux de cultures synthétiques comprenant ces nutriments et facteurs de croissances essentiels pour les cellules. Cependant la composition du SVF est complexe, et n'est pas déterminée à ce jour de manière exhaustive. Cette voie de recherche implique donc un coût de développement très élevé pour de futurs milieux synthétiques. De plus, chaque type cellulaire n'a pas nécessairement les mêmes besoins en termes de nutriments et de facteurs de croissance, ce qui complique encore la mise au point de ce type de sérum synthétique, qui cependant se développe déjà (Gstraunthaler 2003; Ejiri et al. 2015; Dubois et al. 2019) et, à terme,

devrait permettre d'améliorer la répétabilité. Il serait particulièrement intéressant d'utiliser ou de développer ce type de milieu de culture synthétique pour les cellules HepaRG, dans le cadre des études de métabolomique.

- Lors d'une analyse métabolomique, l'intensité du signal correspondant aux différents métabolites détectés lors de l'analyse des résultats est logiquement proportionnelle aux nombres de cellules utilisées lors d'une expérience (Muschet et al. 2016). Lors d'une expérimentation, l'exposition des cellules peut provoquer une mort plus ou moins importante ou altérer la prolifération cellulaire, entraînant des différences dans le nombre de cellules en fonction du traitement et entre les répliques réalisés (León et al. 2013). C'est pourquoi, une estimation de la quantité de cellules (ou un équivalent) dans chaque échantillon est nécessaire dans l'objectif de normaliser les aires, les concentrations ou les abondances relatives obtenues, pour pouvoir comparer l'ensemble des échantillons entre eux. Pour cela, l'évaluation de la quantité de protéines est généralement utilisée comme indicateur de la quantité de cellules dans chaque échantillon (Misra 2020). Lors de ce travail de thèse, l'estimation de la quantité de protéines dans chaque échantillon a été utilisée pour l'étude métabolomique du PFOA. Cependant, il est possible qu'un composé d'intérêt affecte la quantité de protéines en stimulant ou réduisant leur synthèse dans les cellules, sans pour autant augmenter le nombre de cellules dans un échantillon. D'autres techniques de normalisation existent pour la métabolomique et certaines études suggèrent que la mesure de la quantité en ADN d'un échantillon cellulaire permet d'obtenir une normalisation efficace (Hutschenreuther et al. 2012; Silva et al. 2013; Misra 2020). La quantité d'ADN présent dans une cellule est en effet beaucoup moins susceptible d'être affectée que la composition en protéines par un composé d'intérêt. Cependant, le dosage de la quantité d'ADN est

aussi dépendant des solvants organiques utilisés pour l'arrêt du métabolisme cellulaire, puisque certains de ces solvants peuvent potentiellement altérer l'ADN. La mise en place de ce type de dosage demande donc un travail préliminaire d'optimisation de la méthode. En conclusion, beaucoup de questions se posent encore aujourd'hui pour obtenir une bonne normalisation des données en métabolomique à partir de modèles cellulaires. Chaque approche semble apporter des avantages et des inconvénients (Misra 2020). La méthode de normalisation utilisée pour une étude métabolomique doit être réfléchie et adaptée en fonction de chaque étude et de chaque modèle, en fonction des endpoints considérés (Silva et al. 2013). Chaque stratégie de normalisation aura un impact significatif sur la qualité et la distribution des données de métabolomique. La normalisation va donc fortement influencer les conclusions que l'on tire pour une étude.

- Un autre point pouvant introduire de la variabilité est la perturbation des cellules induite par la trypsine lors de l'étape du décollement des cellules de la flasque de culture. Il a été démontré dans plusieurs études que la trypsine peut avoir un fort impact sur la morphologie cellulaire, mais aussi sur le protéome, ce qui pourrait induire des modifications du métabolisme endogène et donc des résultats observés en métabolomique (Teng et al. 2008; Huang et al. 2010; Dettmer et al. 2011). Il existe des méthodes alternatives à la trypsine impliquant d'autres processus enzymatiques visant à digérer les protéines de fixation au support (collagénases, TrypLE) (Tsuji et al. 2017) ou l'utilisation d'une solution de dissociation non enzymatique, qui est parfois préférée pour préserver l'intégrité structurale de la surface de la membrane (Heng et al. 2009). Cependant, l'utilisation de solutions non enzymatiques diminue le nombre de cellules viables obtenues après dissociation (Heng et al. 2009). Une stratégie pour limiter l'impact de la trypsine est de laisser un temps de récupération

aux cellules, pour revenir à un état plus stable. Généralement, ce temps de récupération des cellules n'est pas mentionné dans les études métabolomiques. Lors de cette thèse, nous avons choisi de laisser 3 jours de récupération aux cellules HepaRG avant de les exposer au PFOA. Le temps de récupération qui est recommandé par la société Biopredic est de 8 jours pour les cellules HPR116 à la suite d'une décongélation pour réaliser une étude toxicologique. Cette société a estimé que 8 jours sont nécessaires aux cellules pour retrouver leur structure et des activités métaboliques normales à la suite de cette décongélation (Biopredic International). Pour nos études, cette option n'a pas été sélectionnée car contrairement aux cellules HPR116, nos cellules ont été décongelées au minimum 28 jours avant l'expérience avec une étape de prolifération suivie d'une phase de différenciation. Elles ne subissaient donc pas le stress supplémentaire engendré par la décongélation. Par ailleurs, un temps de récupération plus long pour les cellules pourrait aussi augmenter la variabilité entre les puits avec par exemple un rythme de division cellulaire légèrement différent entre les différents puits. Dans ce travail de thèse, nous avons donc estimé phénotypiquement que 3 jours de récupération étaient suffisants à la suite d'une utilisation de la trypsine pour l'étape de mise en plaque des cellules.

En conclusion, l'ensemble des développements méthodologiques réalisés lors de ce travail a permis de considérablement améliorer la qualité des résultats en métabolomique sur un modèle cellulaire, en diminuant la variabilité introduite lors de la préparation des échantillons et en augmentant la couverture du métabolome sur le même échantillon. Au vue des résultats obtenus lors de ce travail de thèse, les analyses statistiques réalisées pour l'étude des effets du PFOA sur le métabolome montrent que les niveaux de variabilité obtenus sont acceptables pour mettre en évidence des effets biologiques significatifs. En effet, l'utilisation de l'OPLS-DA a permis d'extraire en moyenne 20 % de la variabilité qui n'est pas liée au

facteur biologique d'intérêt. Cette variabilité résiduelle provient probablement de l'expérimentateur et des appareils analytiques utilisés et sera donc difficile à éliminer complètement d'une expérience. L'utilisation de la robotique lorsque cela est possible, notamment pour les étapes de pipetages des échantillons dans les vials pourra cependant limiter une part de variabilité provenant de l'expérimentateur. Pour une application à des études toxicologiques, la prise en compte des perspectives détaillées précédemment pourrait permettre de diminuer encore cette variabilité non liée à l'effet du composé d'intérêt. Il nous semble notamment prioritaire d'adapter la méthode de normalisation utilisée pour l'étude d'un composé tel que le PFOA pouvant agir sur de multiples cibles. Cette étape de normalisation semble en effet avoir un impact important et peut biaiser les conclusions que l'on tire sur les effets d'un composé. Chaque point de perspectives détaillé ici va cependant demander beaucoup de développements et de nombreuses mises au point. Ces développements seront longs à mettre en place, car ils sont dépendant du modèle utilisé et il faudra évaluer l'impact de ces modifications sur une analyse métabolique en passant par des expériences comparatives.

5.2 Bilan et perspectives de l'étude métabolomique du PFOA

Les développements méthodologiques construits durant la première partie de la thèse ont été appliqués à l'étude métabolomique du PFOA, un composé auquel l'Homme est exposé et qui est fortement suspecté d'affecter le foie chez l'Homme (Das et al. 2017). Nos résultats ont montré une perturbation du métabolisme des cellules HepaRG après 1 jour d'exposition, notamment pour ce qui est des acides aminés, des métabolites impliqués dans les principales voies du métabolisme énergétique cellulaire (la glycolyse, le cycle de Krebs, la voie des pentoses phosphate, les voies de biosynthèses des nucléotides), des phospholipides (PE, CER, SM et PC) et du cholestérol. Après 28 jours d'exposition à 10 μM de PFOA, seuls l' α -cétoglutarate, le citrate, le malate et le fumarate ont des niveaux significativement plus élevés.

Les effets du PFOA au niveau hépatique, suggérés par les résultats de ce travail de thèse, nécessitent d'être approfondis. Afin de mieux comprendre les modulations des métabolites observés, il est nécessaire de les replacer dans le contexte global du métabolisme. Pour cela, il est possible d'utiliser les réseaux métaboliques qui regroupent l'ensemble des réactions/métabolites et les interactions entre ces réactions formant des voies métaboliques (Bazzani 2014). Par exemple, la reconstruction la plus récente du réseau métabolique chez l'Homme inclut plus de 13500 réactions et 4140 métabolites (Brunk et al. 2018). L'utilisation de ce type de réseaux pourrait permettre, à partir des métabolites discriminants, de mieux comprendre quelles sont les réactions ou voies biochimiques qui sont modulées par le PFOA. Cependant, l'utilisation de ces réseaux métaboliques nécessite l'identification des métabolites significativement impactés par le PFOA. Au cours de ce travail, plusieurs métabolites discriminants ont été mis en évidence lors des analyses métabolomiques ciblées. L'incorporation de ces métabolites discriminants dans le réseau métabolique humain n'a pas été réalisée pour le moment.

En l'état, pour les analyses réalisées après 1 jour d'exposition au PFOA, il est difficile de cibler une voie métabolique affectée par le PFOA. Les effets observés sont potentiellement biaisés par la normalisation en protéines utilisée et ne nous permettent pas de conclure clairement sur les effets du PFOA après 24 heures d'exposition. Une diminution de l'ensemble métabolites ciblés est en effet observée pour les différentes concentrations de PFOA utilisées par rapport au témoin négatif. L'augmentation significative des taux de protéines mesurés en présence du PFOA peut clairement, par la normalisation des données, être responsable de cette diminution observée dans les concentrations pour les différents métabolites mesurés et biaiser notre interprétation si celle-ci est indépendante d'une augmentation du nombre de cellules. L'augmentation de cette quantité de protéines pourrait être due à la fixation du PFOA sur le récepteur nucléaire PPAR α , induisant la prolifération des peroxyosomes dans les cellules comme démontrée dans de nombreuses études chez les rongeurs à de fortes concentrations (Pastoor et al. 1987; Kennedy et al. 2004). Les peroxyosomes sont en effet des organites intracellulaires fortement impliqués dans les processus de métabolisation des lipides et possèdent donc de nombreuses protéines (Kao et al. 2018). Dans ce cas, il serait donc judicieux de revoir la méthode de normalisation utilisée en utilisant éventuellement la quantité d'ADN qui est par définition beaucoup moins susceptible de varier en présence d'un composé comme le PFOA. De plus, d'autres études ont aussi mis en évidence un impact du PFOA sur la prolifération cellulaire et sur l'activité métabolique des cellules HepG2 à des concentrations légèrement supérieures (10 à 100 μ M) à celles utilisées lors de ce travail de thèse (Buhrke et al. 2015). Il semble donc nécessaire de comprendre les réels effets du PFOA sur la prolifération cellulaire et/ou sur la quantité de protéines intracellulaires afin de pouvoir correctement interpréter les données obtenues pour 1 jour d'exposition.

Après 28 jours d'exposition, l'effet du PFOA sur la quantité de protéines n'a pas été retrouvé. Ceci peut probablement s'expliquer par une adaptation des cellules sur cette longue période d'exposition. C'est pourquoi, la normalisation n'a pas d'effet spécifique sur l'interprétation des données. L' α -cétooglutarate, le citrate, le malate et le fumarate sont les seuls métabolites ciblés dont les concentrations ont été significativement augmentées par le PFOA après 28 jours d'exposition. Cela suggère une possible altération du cycle de Krebs dans la cellule hépatique. Dans la bibliographie, il a été montré que l'augmentation des concentrations des intermédiaires du cycle de Krebs peut provenir d'une altération de l'oxydation des acides gras dans les mitochondries, ce qui peut aboutir au développement de la stéatose hépatique (accumulation de lipides dans le foie) (Burgess et al 2004). La principale cible du PFOA semble être le récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes alpha (PPAR α) (Bjork and Wallace 2009; Bjork et al. 2011). Chez l'animal et chez l'Homme, l'activation de PPAR α entraîne la régulation au niveau hépatique d'une vaste gamme de gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras dans les peroxysomes, les mitochondries et les microsomes (Kersten 2014). Il a notamment été montré que l'oxydation des acides gras est stimulée de manière significative par le PFOA au niveau hépatique *in vivo* (Guruge et al. 2006). La β -oxydation des acides gras est une suite de réactions permettant de dégrader les acides gras (substrats) notamment en acétyl-CoA et en corps cétoniques utilisés ensuite par le cycle de Krebs pour la production d'ATP (Bastin and Djouadi 2019). Plusieurs études suspectent que le PFOA peut affecter la β -oxydation des acides gras notamment par une perturbation du binôme carnitine / acyl-carnitine dans la lignée cellulaire hépatique humaine L-02 et chez les souris au niveau hépatique (Guruge et al. 2006; Peng et al. 2013; Yu et al. 2016). Cette molécule intervient notamment au sein de la β -oxydation dans le transport de l'acétyl-CoA dans les mitochondries. Dans le cadre de cette thèse, cette voie métabolique n'a pas été ciblée dans les analyses métabolomiques réalisées. Il est cependant

possible que les analyses non ciblées réalisées permettent d'observer ces molécules en mode positif ou négatif et apportent plus d'informations sur les modulations de cette voie métabolique. Au cours de ce travail de thèse, une accumulation lipidique a été démontrée uniquement pour une concentration plus élevée en PFOA (100 μ M), après 28 jours d'exposition, et aucun effet n'a été observé sur les niveaux de triglycérides à des concentrations plus faibles. Le développement d'une stéatose hépatique a été observé dans la littérature pour des concentrations en PFOA plus élevées chez les souris pour une exposition allant de 7 à 21 jours (5 à 10 mg/kg/jour) (Tan et al. 2013; Das et al. 2017), mais aussi sur le modèle HepaRG après 24 heures de traitement à 200 μ M (Louisse et al. 2020). Seule l'étude proposée par Franco et ses collaborateurs a montré une augmentation des taux de triglycérides après exposition du modèle HepaRG pendant 72 heures à seulement 1 μ M de PFOA (Franco et al. 2020), ce qui est contradictoire avec toutes les autres études disponibles dans la bibliographie montrant une accumulation de lipides, mais uniquement à de fortes concentrations. Il est possible que l'accumulation de lipides ne soit pas assez prononcée dans notre étude aux concentrations sélectionnées, il serait par exemple intéressant de voir s'il est possible d'observer une altération de certains métabolites pouvant être des biomarqueurs précoces du développement d'une stéatose hépatique sur ce modèle. Certaines études ont notamment initié un travail d'observation de la progression de la stéatose hépatique sur le modèle HepaRG en utilisant la métabolomique. Par exemple, des marqueurs précoces du développement de la stéatose comme la spermidine, la créatine et l'acétylcholine ont été identifiés (Cuykx et al. 2018). L'effet du PFOA sur ces métabolites, qui n'ont pas été ciblés lors de ce travail de thèse, pourrait éventuellement être observé sur les analyses non ciblées réalisées.

Au-delà de la modulation des métabolites ciblés lors de cette étude, les analyses non ciblées réalisées montrent aussi que des métabolites, qui n'ont pas été identifiés, varient en fonction des conditions d'exposition au PFOA.

L'ensemble des analyses non ciblées a été réalisé sur la phase polaire obtenue avec le protocole de double extraction en modes positif et négatif. Ces analyses pourraient être complétées par des analyses non ciblées sur la phase apolaire, ce qui permettrait de rechercher la modulation d'autres métabolites pouvant être affectés par le PFOA, comme par exemple les acides biliaires qui sont aussi suspectés d'être affectés par le PFOA au niveau hépatique (Behr et al. 2020). La suite de ce travail consiste à identifier les ions qui ont été affectés par le PFOA lors des analyses métabolomiques non ciblées. Ces identifications seront complémentaires à celles des métabolites déjà mis en évidence lors des analyses métabolomiques ciblées et permettront, avec l'utilisation des réseaux métaboliques, de compléter la caractérisation des voies affectées par le PFOA. Pour cette identification, plusieurs stratégies sont possibles avec l'utilisation de la SDM (Bingol et al. 2016). Le développement de bases de données internes dans les laboratoires est idéal car elles permettent de directement valider la structure d'un métabolite inconnu. En effet, cela permet d'observer un métabolite dans les mêmes conditions expérimentales d'analyse (colonne chromatographique, gradient analytique, appareillages, etc.) et ainsi avoir accès à l'ensemble des ions produits pour un métabolite. Cependant, cette approche demande un gros investissement dans l'achat de molécules de référence (standards analytiques) ainsi que beaucoup de temps. De plus, certains standards ne sont pas disponibles dans le commerce. Dans ce cas, il est possible d'utiliser la SDM en tandem pour remonter à la structure par une ou plusieurs fragmentations des ions d'intérêts (Lynn et al. 2015). Des infrastructures telles que MetaboHub en France ont initié la construction des bases de données inter-laboratoires (Peakforest) permettant de faciliter l'identification de nombreux métabolites en RMN et en SDM.

Une autre stratégie d'étude du PFOA a commencé à être envisagée lors de ce travail. Le principe de cette approche est de considérer des variations observées dans la consommation ou la production de métabolites dans le milieu extracellulaire peuvent refléter une modulation des flux intracellulaires. Ainsi, l'ensemble des métabolites dont la consommation ou la production est significativement modulée par rapport à une condition contrôle peuvent permettre de prédire, à l'aide de leur modélisation dans le réseau métabolique humain, les voies métaboliques impactées par le composé étudié. Dans la littérature, l'utilisation de la métabolomique sur le milieu extracellulaire a déjà mis en évidence des différences sur le métabolisme endogène entre différentes lignées cellulaires de leucémie lymphoblastique (Aurich et al. 2015). Ce type d'approche utilisant le milieu extracellulaire peut présenter certains avantages en comparaison avec une analyse métabolomique plus classique sur les contenus cellulaires. En effet, une analyse métabolomique sur les contenus intracellulaires donne une image à un instant donné du métabolisme endogène, qui est par conséquent très dépendante du moment de l'arrêt du métabolisme. À l'inverse, le milieu extracellulaire représente l'augmentation ou la réduction de métabolites qui sont produits et excrétés pendant un intervalle de temps donné et son analyse permet donc d'évaluer des effets métaboliques sur une période plus large, avec par conséquent moins de variabilité. Cela permet de mieux comprendre le fonctionnement d'un modèle donné, et particulièrement le modèle HepaRG qui est de plus en plus utilisé dans des études toxicologiques. Avoir accès à l'information des modulations des métabolites extracellulaires et intracellulaires à la fois est très pertinent, car cela permet d'avoir une image plus globale des effets d'un composé sur le modèle. La mesure de la concentration d'un métabolite en intracellulaire et en extracellulaire est potentiellement complémentaire. Il est par exemple possible que la production d'un métabolite intracellulaire soit stimulée dans une condition biologique donnée, sans qu'il soit excrété. D'autres métabolites peuvent être excrétés, soit pour des raisons d'homéostasie

cellulaire, favorisant ainsi une certaine stabilité du métabolome intracellulaire, soit parce que leur transport (passif ou actif) vers la matrice extracellulaire est favorisé dans les conditions expérimentales. Dans ces cas, il est envisageable que la mise en évidence d'une modulation ne puisse être réalisée qu'à partir des milieux extracellulaires. Au cours des expériences réalisées pour étudier les effets du PFOA sur le milieu intracellulaire, les milieux extracellulaires ont aussi été récupérés au terme de l'exposition (à 1 jour et 28 jours) ainsi qu'avant l'exposition des cellules HepaRG, soit en conditions basales. La quantification absolue des métabolites présents dans les milieux extracellulaires dans ces échantillons prélevés à des temps différents pourrait donc donner des informations précieuses sur les métabolites qui sont produits ou consommés par les cellules. Pour une étude des effets de contaminants alimentaires, ce type d'approche est très prometteuse mais doit encore être validée pour la mise en évidence des effets d'un composé d'intérêt à de faibles concentrations dans les milieux extracellulaires. Par manque de temps, l'analyse des milieux extracellulaires, qui a bien été envisagée dans ce travail de thèse, est encore en cours de réalisation et n'a pas été intégrée dans ce manuscrit car nous avons en effet fait le choix de prioriser dans un premier temps les approches plus classiques sur les milieux intracellulaires.

Lors de cette thèse, l'utilisation de PFOA radiomarqué a aussi montré qu'une très faible proportion (<0,5 %) du PFOA administré pénètre dans les cellules. Par ailleurs, le PFOA n'est pas métabolisé par les cellules HepaRG, qui sont pourtant des cellules métaboliquement compétentes (Hart et al. 2010). Ces résultats sont en accord avec l'ensemble des études disponibles dans la littérature sur de nombreux modèles cellulaires et subcellulaires quant à l'absence de biotransformation de ce PFAS (Vanden Heuvel et al. 1991; Kemper and Nabb 2005; EFSA 2018). Ceci indique que les effets observés proviennent uniquement du PFOA, et semblent être induits même par de très faibles concentrations de PFOA pénétrant dans les cellules. On ne peut aussi pas exclure que le PFOA agisse de manière

indirecte par l'intermédiaire de récepteur(s) situé(s) sur la membrane extracellulaire. Cependant, aucune étude validant cette hypothèse pour le PFOA ou pour d'autres xénobiotiques n'a été rapportée à ce jour dans la littérature. De nombreuses études suggèrent une fixation au niveau hépatique sur des récepteurs nucléaires tels que PPAR α , ER α ou CAR (Rosen et al. 2008; Bjork et al. 2011; Qiu et al. 2020). Ces résultats impliquent une entrée du PFOA dans les cellules et une pénétration de la membrane nucléaire. Dans ces études, le taux de pénétration du PFOA dans les cellules n'a pas été mesuré. De fait, d'autres études *in vivo*, nous donnent des éléments de raisonnement à ce sujet : chez l'Homme, le PFOA a été détecté dans le foie (post-mortem) à une concentration moyenne de 13.6 ng/g (Pérez et al. 2013), mais cette étude a été menée sur seulement 20 individus. Chez les animaux, des études démontrent aussi une entrée du PFOA dans le foie en quantifiant ce composé dans cet organe par spectrométrie de masse, cependant l'ensemble de ces études a été réalisé à très fortes concentrations (5 à 10 mg/kg) (Hundley et al. 2006). Dans la littérature, il a déjà été démontré que le PFOA possède une forte affinité avec les protéines sériques comme l'albumine (Han et al. 2003; Forsthuber et al. 2020). Il est donc possible que les quantités mesurées dans ces études soient en réalité du PFOA qui était fixé aux protéines plasmatiques. Lors de ce travail de thèse, du SVF contenant des protéines plasmatiques a été utilisé pour la culture des cellules HepaRG. Ce SVF est notamment indispensable dans l'apport de nutriments et pour une culture à long terme qui est un des principaux avantages des cellules HepaRG. Cependant, il est probable que la présence de protéines dans le milieu de culture des modèles cellulaires limite la pénétration du PFOA dans les cellules. De plus, un modèle cellulaire est généralement cultivé dans une flasque et ne présente pas les caractéristiques structurelles que l'on peut retrouver pour un foie (ou un lobe de foie), que ce soit chez l'Homme ou l'animal, puisqu'en culture cellulaire, l'architecture tissulaire n'est généralement pas conservée. C'est pourquoi, il est possible que l'utilisation d'un modèle cellulaire pour étudier

la pénétration d'un composé tel que le PFOA présente quelques limites. L'utilisation des cellules HepaRG en trois dimensions (sphéroïdes) pourrait être une alternative afin de se rapprocher de la structure en trois dimensions d'un foie. Cependant, l'étude de la métabolisation et de la pénétration d'un composé sur des modèles *in vitro* en trois dimensions demande encore des développements méthodologiques, notamment en ce qui concerne la sensibilité de détection des métabolites formés, aux vues des faibles quantités de cellules requises pour la formation d'un sphéroïde qui est largement inférieures aux études réalisées en deux dimensions. La ligné cellulaire HepaRG semble tout de même exprimer la plupart des transporteurs transmembranaires hépatiques (Le Vee et al. 2013). Aussi, même si certains transporteurs impliqués dans l'absorption du PFOA peuvent être absents sur le modèle HepaRG, aucune étude n'a pour le moment caractérisé clairement les mécanismes de pénétration du PFOA dans les cellules. Il pourrait aussi être pertinent de tenter d'estimer la pénétration du PFOA à des faibles concentrations sur d'autres modèles hépatiques, plus proches structurellement d'un foie humain comme par exemple avec des tranches (Precision-cut tissue slices) de tissus animaux (Soldatow et al. 2013) très fines (300 µm d'épaisseur) obtenues à partir de carottes hépatiques. Ce type d'expérience est lourd et l'utilisation d'un modèle animal s'éloigne forcément de ce qui est observé chez l'Homme au vue des différences observées pour ce composé entre les espèces (Pizzurro et al. 2019). Cependant, ce modèle est accessible à Toxalim, et une expérimentation de ce type, avec un modèle où l'architecture hépatique est mieux conservée, devrait permettre de progresser dans la connaissance des mécanismes de pénétration hépatique du PFOA. Cependant, plusieurs types de populations sont présentes dans ce type de modèle, ce qui implique une perte d'information concernant la pénétration du composé dans un type de cellules spécifique. L'utilisation de l'imagerie par SDM, sur ce type de modèle, sur des foies perfusés, ou sur des foies prélevés à partir d'expérimentations d'exposition *in vivo*, pourraient également s'avérer

pertinente dans le cas de ces molécules d'intérêt. En effet, rien n'indique que, pour les études réalisées avec d'autres modèles que le nôtre, la pénétration du PFOA ait été meilleure que dans notre étude, qui est à notre connaissance la seule à ce jour à avoir tenté de quantifier le PFOA intracellulaire sur un modèle *in vitro*, et ce grâce à l'emploi d'une molécule radiomarquée.

En conclusion, l'ensemble des travaux réalisés lors de cette thèse a permis d'apporter des améliorations notables dans la robustesse des résultats obtenus en métabolomique sur cellules adhérentes. Ces développements ont été réalisés en utilisant la lignée cellulaire HepaRG, qui est de plus en plus employée notamment dans le domaine de la toxicologie. Ils peuvent néanmoins facilement être appliqués à de nombreuses lignées cellulaires existantes. Ces développements pourront aussi favoriser l'utilisation de modèles *in vitro* en métabolomique afin de limiter l'utilisation des animaux, qui pose aujourd'hui de nombreux problèmes éthiques (Kandárová and Letašiová 2011). Lors de ce travail, nous avons cherché à tester l'effet d'expositions à des concentrations cohérentes avec les différents scénarios d'exposition humaine en PFOA. Ce type d'étude est particulièrement nécessaire pour les agences de sécurité alimentaire ou chimique telles que l'ANSES (France), l'ECHA (UE), l'EFSA (UE), ou encore l'US-EPA (USA), qui sont chargées d'évaluer les risques liés à l'exposition à des xénobiotiques. Parmi les études disponibles à ce jour dans la bibliographie, une majorité a utilisé de fortes concentrations en PFOA, en mettant en évidence des effets au niveau hépatique chez les rongeurs ou sur des modèles hépatiques humains avec des concentrations étant au minimum 10 fois supérieures aux concentrations utilisées dans notre étude (Tan et al. 2013; Peng et al. 2013; Yu et al. 2016; Zheng et al. 2017; Louisse et al. 2020). Ces études ne sont pas nécessairement représentatives des conditions d'exposition humaine à ce composé, ni des concentrations attendues au niveau tissulaire. Bien que la métabolomique ne soit pour le moment pas utilisée par les agences d'évaluation du risque

chimiques ou alimentaires ou dans les procédures standardisées visant à caractériser les effets toxiques d'un composé, il est probable que les études basées sur cette approche soient de plus en plus considérées à l'avenir par ces agences. Elle est en effet suffisamment sensible pour mettre en évidence les effets d'un composé d'intérêt retrouvé chez l'Homme à de très faibles concentrations sur des modèles *in vitro* compatibles avec le bien-être animal. Dans ce cadre, l'ensemble des développements réalisés dans ce travail sera particulièrement utile à l'avenir, notamment dans le domaine de la toxicologie et particulièrement la toxicologie alimentaire. Nous pensons qu'ils permettront de considérablement améliorer les expériences menées sur les perturbateurs métaboliques tels que le PFOA pouvant avoir des effets difficiles à mettre en évidence par des approches toxicologiques classiques lorsque l'on s'intéresse aux faibles doses d'exposition, et pouvant avoir un impact sur de multiples voies métaboliques. Par exemple, il existe d'autres composés appartenant à la famille des PFAS tels que le PFOS, le PFHxS, le GenX et l'ADONA qui sont, comme le PFOA, suspectés d'avoir des effets chez l'Homme (Gaballah et al. 2020). De plus, l'Homme est potentiellement exposé simultanément à une multitude de PFAS. La métabolomique ouvre également des voies pour explorer les effets de ces PFAS en mélange, voire de mélanges plus complexes tentant de reproduire des scénarios reflétant de façon encore plus exhaustive l'exposome chimique.

Annexes

➤ **Annexe 1 : Analyses des métabolites polaires et lipides**

● **Analyse des acides aminés**

L'analyse des acides aminés a été effectuée comme décrit précédemment par Heuillet ses collaborateurs (Heuillet et al. 2018). En résumé, l'analyse a été effectuée par chromatographie liquide (HPLC U3000, Dionex) couplée à un spectromètre de masse Qexactive (Thermo Fisher Scientific) équipé d'une source d'ionisation electrospray. Les analyses de SDM ont été effectuées en mode positif à une résolution de 60 000 et avec les paramètres suivants : la température capillaire était de 275 °C, la température du réchauffeur de source était de 250 °C et la tension de source était de 5 kV. Concernant la phase stationnaire, les échantillons ont été injectés sur une colonne Supelco HSF5 (150 mm × 2,1 mm ; taille de particules de 5 µm) équipée d'une pré-colonne Supelco HSF5 (20 mm × 2,1 mm ; taille de particules de 5 µm). Concernant les phases mobiles, le solvant A était de l'eau contenant 0,1 % d'acide formique et le solvant B de l'acétonitrile avec 0,1 % d'acide formique à un débit de 250 µL.min⁻¹. Le gradient du solvant B utilisé variait comme suit : 0 min : 2 %, 2 min : 2 %, 10 min : 5 %, 16 min : 35 %, 20 min : 100 %, 24 min : 100 %, 24.1 min : 2 % et 30 min : 2 %. Le volume de l'injection était de 5 µL. L'identification a été réalisée en extrayant la masse exacte des acides aminés avec une précision de masse de 5 ppm. L'ensemble des acides aminés mesurés par cette méthode analytique est résumé dans le tableau ci-dessous.

Acides aminés mesurés par les analyses ciblées quantitatives en spectrométrie de masse.

Métabolite	Abréviation	Type de quantification	Techniques analytiques	Formule brute
Alanine	Ala	Absolue	LC-MS mode +	C ₃ H ₇ N ₁ O ₂
Arginine	Arg	Absolue	LC-MS mode +	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂
Asparagine	Asg	Absolue	LC-MS mode +	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃
Aspartate	Asp	Absolue	LC-MS mode +	C ₄ H ₇ N ₁ O ₄
Glutamate	Glu	Absolue	LC-MS mode +	C ₅ H ₉ N ₁ O ₄
Glutamine	Gln	Absolue	LC-MS mode +	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃
Glycine	Gly	Absolue	LC-MS mode +	C ₂ H ₅ N ₁ O ₂
Histidine	His	Absolue	LC-MS mode +	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂
Isoleucine	Ile	Absolue	LC-MS mode +	C ₆ H ₁₃ N ₁ O ₂
Leucine	Leu	Absolue	LC-MS mode +	C ₆ H ₁₃ N ₁ O ₂
Lysine	Lys	Absolue	LC-MS mode +	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂
Méthionine	Met	Absolue	LC-MS mode +	C ₅ H ₁₁ N ₁ O ₂ S
Phénylalanine	Phe	Absolue	LC-MS mode +	C ₉ H ₁₁ N ₁ O ₂
Proline	Pro	Absolue	LC-MS mode +	C ₅ H ₉ N ₁ O ₂
Sérine	Ser	Absolue	LC-MS mode +	C ₃ H ₇ N ₁ O ₃
Thréonine	Thr	Absolue	LC-MS mode +	C ₄ H ₉ N ₁ O ₃
Tryptophane	Trp	Absolue	LC-MS mode +	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂
Tyrosine	Tyr	Absolue	LC-MS mode +	C ₉ H ₁₁ N ₁ O ₃
Valine	Val	Absolue	LC-MS mode +	C ₅ H ₁₁ N ₁ O ₂

- **Analyse des métabolites énergétiques**

L'analyse des métabolites énergétiques a été réalisée par chromatographie à échange d'anions à haute performance (système Dionex ICS 5000+) couplée à un spectromètre de masse LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific) équipé d'une source d'ionisation electrospray. Les échantillons ont été analysés en mode négatif à une résolution de 60 000 avec les paramètres de source suivants : la température capillaire était de 300 °C, la température du réchauffeur de source était de 250 °C et la tension de source était de 2,5 kV. Le volume d'injection était de 15 µL. Les échantillons ont été injectés sur une colonne Dionex IonPac AS11 (250 x 2 mm) équipée d'une colonne de garde Dionex AG11 (50 x 2 mm). La phase mobile était composée d'un gradient de KOH qui varie comme suit : 0 min : 0,5 %, 1 min : 0,5 %, 9,5 min : 4,1 %, 14,6 min : 4,1 %, 24 min : 9,65 %, 36 min : 60 %, 36,1 min : 90 %, 43 min : 90 %, 43,1 min : 0,5 %, 45 min : 0,5%. L'ensemble des métabolites énergétiques mesurés par cette méthode analytique est résumé dans le tableau ci-dessous.

Métabolites énergétiques mesurés par les analyses ciblées quantitatives en spectrométrie de masse

Métabolite	Abréviation	Type de quantification	Techniques analytiques	Formule brute
2,3 bisphosphoglycérate	2_3-PG	Absolue	IC-MS mode -	C3H8O10P2
6 phosphogluconate	6-PG	Absolue	IC-MS mode -	C6H13O10P
Alpha cétooglutarate	a-KG	Absolue	IC-MS mode -	C5H6O5
Adénosine monophosphate	AMP	Absolue	IC-MS mode -	C10H14N5O7P
Cytidine diphosphate	CDP	Absolue	IC-MS mode -	C9H15N3O11P2
Cytidine monophosphate	CMP	Absolue	IC-MS mode -	C9H14N3O8P

N Acétylglucosamine 1 phosphate	GlcNAc-1P	Absolue	IC-MS mode -	C8H16NO9P
N Acétylglucosamine 6 phosphate	GlcNAc-6P	Absolue	IC-MS mode -	C8H16NO9P
Fructose 6 phosphate	F6P	Absolue	IC-MS mode -	C6H13O9P
Fructose 1 phosphate	F1P	Absolue	IC-MS mode -	C6H13O9P
Fructose bisphosphate	FBP	Absolue	IC-MS mode -	C6H14O12P2
Glucose 6 phosphate	Glc6P	Absolue	IC-MS mode -	C6H13O9P
Glucose 1 phosphate	Glc1P	Absolue	IC-MS mode -	C6H13O9P
Glycérol 3 Phosphate	Gly3P	Absolue	IC-MS mode -	C3H9O6P
Guanosine monophosphate	GMP	Absolue	IC-MS mode -	C10H14N5O8P
Pyridoxal 5 phosphate	P5P	Absolue	IC-MS mode -	C8H10NO6P
Phosphoénolpyruvate	PEP	Absolue	IC-MS mode -	C3H5O6P
Uridine diphosphate	UDP	Absolue	IC-MS mode -	C9H14N2O12P2
Adénosine diphosphate	ADP	Relative	IC-MS mode -	C10H15N5O10P2
Adénosine triphosphate	ATP	Relative	IC-MS mode -	C10H16N5O13P3
Cytidine triphosphate	CTP	Relative	IC-MS mode -	C9H16N3O14P3
Phosphosérine	P-Ser	Relative	IC-MS mode -	C3H8NO6P
Sédoheptulose 7 phosphate	Sed-7P	Absolue	IC-MS mode -	C7H15O10P
Uridine diphosphate N-acétylglucosamine	UDP-AcGlcN	Relative	IC-MS mode -	C17H27N3O17P2

Uridine diphosphate glucose	UDP-Glc	Relative	IC-MS mode -	C15H24N2O17P2
Uridine monophosphate	UMP	Relative	IC-MS mode -	C9H13N2O9P
Uridine triphosphate	UTP	Relative	IC-MS mode -	C9H15N2O15P3
2 Hydroxyglutarate	2-OHGluc	Absolue	IC-MS mode -	C5H8O5
Guanosine diphosphate	GDP	Absolue	IC-MS mode -	C16H25N5O16P2
Citrate	Cit	Relative	IC-MS mode -	C6H8O7
Isocitrate	IsoCit	Relative	IC-MS mode -	C6H8O7
Malate	Mal	Relative	IC-MS mode -	C4H6O5
Mannose 6 phosphate	Man6P	Absolue	IC-MS mode -	C6H13O9P
Fumarate	Fum	Absolue	IC-MS mode -	C6H8O4

- **Analyse des phospholipides et sphingolipides**

Après récupération et évaporation de la phase organique, les lipides extraits ont été remis en suspension dans 50 µL de méthanol. Les phospholipides et sphingolipides ont été analysés par chromatographie liquide, Infinity 1290 (Agilent, USA), couplée à un triple quadripôle 6460 (Agilent Technologie, USA) équipé d'une source d'ionisation electrospray. Les échantillons ont été analysés en mode d'ionisation positif pour les céramides (Cer), les sphingomyélines (SM), les phosphoéthanolamines (PE), les phosphocholines (PC) et en mode négatif pour les phosphatidylinositols (PI). Les paramètres de source étaient les suivants : température de la source 325°C, tension de pulvérisation 4000 V. Une colonne HILIC (50 x 4,6 mm, 2,6 µm, Phenomenex), maintenue à 40°C a été utilisée, avec une phase mobile A composée d'acétonitrile et une phase mobile B composée d'eau avec 10 mM d'acétate d'ammonium. En mode

positif, le solvant B a varié comme suit : 0 min : 10 %, 10 min : 30 %, 11 min :100 %, 12 min :100 %, 13 min :10 %, 15 min :10 %. Le débit était de 300 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ et le volume de l'injection était de 2 μL . En mode négatif, le solvant B a varié selon le gradient suivant : 0 min : 5 %, 10 min :50 %,11 min :5 %, 15 min :5 %. Le débit était de 800 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ et le volume de l'injection était de 5 μL . L'ensemble des lipides mesurés par cette méthode analytique a été résumé dans le tableau ci-dessous.

Phospholipides et sphingolipides mesurés par les analyses ciblées en spectrométrie de masse. Pour chaque métabolite, le nombre de carbone suivis du nombre d'insaturation est indiqué entre parenthèse.

Famille de molécules	Métabolite	Type de quantification	Techniques analytiques	Formule brute
Diacylglycérophosphocholines	PC (28a:0)	Relative	LC-MS mode -	C36H72NO8P
Diacylglycérophosphocholines	PC (30a:0)	Relative	LC-MS mode -	C38H76NO8P
Diacylglycérophosphocholines	PC (30a:1)	Relative	LC-MS mode -	C38H74NO8P
Diacylglycérophosphocholines	PC (32a:0)	Relative	LC-MS mode -	C40H80NO8P
Diacylglycérophosphocholines	PC (32a:1)	Relative	LC-MS mode -	C40H78NO8P
Diacylglycérophosphocholines	PC (32a:2)	Relative	LC-MS mode -	C40H76NO8P
Diacylglycérophosphocholines	PC (34a:0)	Relative	LC-MS mode -	C42H84NO8P
Diacylglycérophosphocholines	PC (34a:1)	Relative	LC-MS mode -	C42H82NO8P
Diacylglycérophosphocholines	PC (34a:2)	Relative	LC-MS mode -	C42H80NO8P
Diacylglycérophosphocholines	PC (34a:3)	Relative	LC-MS mode -	C42H78NO8P
Diacylglycérophosphocholines	PC (36a:1)	Relative	LC-MS mode -	C44H86NO8P
Diacylglycérophosphocholines	PC (36a:2)	Relative	LC-MS mode -	C44H84NO8P
Diacylglycérophosphocholines	PC (36a:3)	Relative	LC-MS mode -	C44H82NO8P

Diacylglycérophosphocholines	PC (36a:4)	Relative	LC-MS mode -	C44H80NO8P
Diacylglycérophosphocholines	PC (38a:2)	Relative	LC-MS mode -	C46H88NO8P
Diacylglycérophosphocholines	PC (38a:3)	Relative	LC-MS mode -	C46H86NO8P
Diacylglycérophosphocholines	PC (38a:4)	Relative	LC-MS mode -	C46H84NO8P
Diacylglycérophosphocholines	PC (38a:5)	Relative	LC-MS mode -	C46H82NO8P
Diacylglycérophosphocholines	PC (38a:6)	Relative	LC-MS mode -	C46H80NO8P
Diacylglycérophosphocholines	PC (40a:3)	Relative	LC-MS mode -	C48H90NO8P
Diacylglycérophosphocholines	PC (40a:6)	Relative	LC-MS mode -	C48H84NO8P
Diacylglycérophosphoinositols	PI (32:1)	Relative	LC-MS mode +	C41H77O13P
Diacylglycérophosphoinositols	PI (34:1)	Relative	LC-MS mode +	C43H81O13P
Diacylglycérophosphoinositols	PI (34:2)	Relative	LC-MS mode +	C43H79O13P
Diacylglycérophosphoinositols	PI (36:0)	Relative	LC-MS mode +	C45H87O13P
Diacylglycérophosphoinositols	PI (36:1)	Relative	LC-MS mode +	C45H85O13P
Diacylglycérophosphoinositols	PI (36:2)	Relative	LC-MS mode +	C45H83O13P
Diacylglycérophosphoinositols	PI (36:3)	Relative	LC-MS mode +	C45H81O13P
Diacylglycérophosphoinositols	PI (38:1)	Relative	LC-MS mode +	C47H89O13P
Diacylglycérophosphoinositols	PI (38:2)	Relative	LC-MS mode +	C47H87O13P
Diacylglycérophosphoinositols	PI (38:3)	Relative	LC-MS mode +	C47H85O13P
Diacylglycérophosphoinositols	PI (38:4)	Relative	LC-MS mode +	C47H83O13P
Diacylglycérophosphoinositols	PI (38:5)	Relative	LC-MS mode +	C47H81O13P
Diacylglycérophosphoinositols	PI (40:2)	Relative	LC-MS mode +	C49H90O13P
Diacylglycérophosphoinositols	PI (40:3)	Relative	LC-MS mode +	C49H88O13P

Diacylglycérophosphoinositols	PI (40:4)	Relative	LC-MS mode +	C49H87O13P
Diacylglycérophosphoinositols	PI (40:5)	Relative	LC-MS mode +	C49H85O13P
Diacylglycérophosphoinositols	PI (40:6)	Relative	LC-MS mode +	C49H83O13P
Diacylglycérophosphoéthanolamines	PE (32a:0)	Relative	LC-MS mode -	C37H74N08P
Diacylglycérophosphoéthanolamines	PE (32a:1)	Relative	LC-MS mode -	C37H72N08P
Diacylglycérophosphoéthanolamines	PE (32a:2)	Relative	LC-MS mode -	C37H70N08P
Diacylglycérophosphoéthanolamines	PE (34a:0)	Relative	LC-MS mode -	C39H78N08P
Diacylglycérophosphoéthanolamines	PE (34a:1)	Relative	LC-MS mode -	C39H76N08P
Diacylglycérophosphoéthanolamines	PE (36a:1)	Relative	LC-MS mode -	C41H80N08P
Diacylglycérophosphoéthanolamines	PE (36a:2)	Relative	LC-MS mode -	C41H78N08P
Diacylglycérophosphoéthanolamines	PE (36a:3)	Relative	LC-MS mode -	C41H76N08P
Diacylglycérophosphoéthanolamines	PE (36a:4)	Relative	LC-MS mode -	C41H74N08P
Diacylglycérophosphoéthanolamines	PE (38a:2)	Relative	LC-MS mode -	C43H82N08P
Diacylglycérophosphoéthanolamines	PE (38a:3)	Relative	LC-MS mode -	C43H80N08P
Diacylglycérophosphoéthanolamines	PE (38a:4)	Relative	LC-MS mode -	C43H78N08P
Diacylglycérophosphoéthanolamines	PE (38a:5)	Relative	LC-MS mode -	C43H76N08P
Diacylglycérophosphoéthanolamines	PE (38a:6)	Relative	LC-MS mode -	C43H74N08P
Diacylglycérophosphoéthanolamines	PE (40a:3)	Relative	LC-MS mode -	C45H84N08P
Diacylglycérophosphoéthanolamines	PE (40a:5)	Relative	LC-MS mode -	C45H80N08P
Diacylglycérophosphoéthanolamines	PE (40a:6)	Relative	LC-MS mode -	C45H78N08P
Diacylglycérophosphoéthanolamines	PE (40a:7)	Relative	LC-MS mode -	C45H76N08P

Céramides	Cer (d18:1/16:0)	Relative	LC-MS mode -	C34H67NO3
Céramides	Cer (d18:1/16:1)	Relative	LC-MS mode -	C34H65NO3
Céramides	Cer (d18:1/18:0)	Relative	LC-MS mode -	C36H71NO3
Céramides	Cer (d18:1/18:1)	Relative	LC-MS mode -	C36H69NO3
Céramides	Cer(d18:1/20:0)	Relative	LC-MS mode -	C38H75NO3
Céramides	Cer (d18:1/22:0)	Relative	LC-MS mode -	C40H79NO3
Céramides	Cer (d18:1/24:0)	Relative	LC-MS mode -	C42H83NO3
Céramides	Cer (d18:1/24:1)	Relative	LC-MS mode -	C42H81NO3
Céramides	Cer (d18:1/26:0)	Relative	LC-MS mode -	C44H87NO3
Céramides	Cer (d18:1/26:1)	Relative	LC-MS mode -	C44H85NO3
Sphingomyélines	SM (d18:1/14:0)	Relative	LC-MS mode -	C37H75N2O6P
Sphingomyélines	SM (d18:1/16:0)	Relative	LC-MS mode -	C39H79N2O6P
Sphingomyélines	SM (d18:1/16:1)	Relative	LC-MS mode -	C39H77N2O6P
Sphingomyélines	SM (d18:1/18:0)	Relative	LC-MS mode -	C41H83N2O6P

Sphingomyélines	SM (d18:1/18:1)	Relative	LC-MS mode -	C41H81N2O6P
Sphingomyélines	SM (d18:1/20:0)	Relative	LC-MS mode -	C43H87N2O6P
Sphingomyélines	SM (d18:1/20:1)	Relative	LC-MS mode -	C43H85N2O6P
Sphingomyélines	SM (d18:1/22:0)	Relative	LC-MS mode -	C45H91N2O6P
Sphingomyélines	SM (d18:1/22:1)	Relative	LC-MS mode -	C45H89N2O6P
Sphingomyélines	SM (d18:1/24:0)	Relative	LC-MS mode -	C47H95N2O6P
Sphingomyélines	SM (d18:1/24:1)	Relative	LC-MS mode -	C47H93N2O6P

- **Analyse des lipides neutres**

Les lipides extraits ont été remis en suspension dans 20 µl d'acétate d'éthyle et 1 µl a été injecté pour analyser les lipides neutres par chromatographie gazeuse sur un système Focus Thermo Electron utilisant une colonne capillaire en silice fondue Zebron-1 Phenomenex (5 m, 0,32 mm de diamètre intérieur, 0,50 mm d'épaisseur de film). La température a été programmée de 200 à 350°C à un taux de 5°C/min où le gaz porteur était de l'hydrogène (0,5 bar). L'injecteur et le détecteur étaient respectivement à 315 et 345°C. L'ensemble des lipides neutres mesurés par cette méthode analytique a été résumé dans le tableau ci-dessous.

Lipides neutres mesurés par les analyses ciblées en spectrométrie de masse. Pour chaque métabolite, le nombre de carbone suivis du nombre d'insaturation est indiqué entre parenthèse.

Famille de molécules	Métabolite	Type de quantification	Technique analytique	Formule brute
Cholestérol	Cholestérol	Relative	GC-MS	C ₂₇ H ₄₆ O
Triacylglycérols	TAG (46:0)	Relative	GC-MS	C ₄₉ H ₉₄ O ₆
Triacylglycérols	TAG (48:0)	Relative	GC-MS	C ₅₁ H ₉₈ O ₆
Triacylglycérols	TAG (50:0)	Relative	GC-MS	C ₅₃ H ₁₀₂ O ₆
Triacylglycérols	TAG (52:0)	Relative	GC-MS	C ₅₅ H ₁₀₆ O ₆
Triacylglycérols	TAG (54:0)	Relative	GC-MS	C ₅₇ H ₁₁₀ O ₆
Triacylglycérols	TAG (56:0)	Relative	GC-MS	C ₅₉ H ₁₁₄ O ₆

➤ **Annexe 2 : Déroulement d'une analyse non ciblée par XCMS**

Pour les deux étapes permettant la génération des données en métabolomique non ciblée, deux workflows ont été créés lors de cette thèse afin d'automatiser le retraitement de données et de limiter les erreurs.

• **Les étapes de génération des données.**

Cette étape a pour but de détecter l'ensemble des pics d'un chromatogramme et de les regrouper pour les associer à une masse et un temps de rétention. Cette première étape permet de générer 3 fichiers indispensables regroupant l'ensemble des informations concernant chaque variable détectée, incluant son temps de rétention, la masse, l'aire intégrée, etc. On distingue ainsi la « *samplemetadata* » qui est un fichier à construire manuellement regroupant l'ensemble des informations sur les échantillons. Il permet d'associer chaque échantillon aux paramètres de l'expérience tels que le type d'échantillon (blancs, échantillons, QC, etc.), le réplica biologique, la condition biologique, etc. XCMS génère les deux autres fichiers, la « *variablemetadata* » contient l'ensemble des informations caractérisant chaque variable tel que la masse, le temps de rétention ainsi que des informations statistiques comme les coefficients de variations dans les QC, la moyenne dans les échantillons blancs, etc. Le dernier fichier créé est la « *datamatrix* » qui comporte l'ensemble des valeurs d'intégrations réalisées pour chaque variable et dans chaque échantillon.

La *samplemetadata* doit être créée en amont sous le format .txt (tabulation) et joue déjà un rôle important dans l'intégration des données. Lors de cette thèse la *samplemetadata* a été construit comme décrit ci-dessous :

• **Colonne 1 : « *sample_name* »**

Liste des noms des fichiers insérés dans XCMS. A noter qu'il faut absolument garder le même nom y compris les majuscules, afin d'éviter les problèmes avec XCMS. Il est conseillé d'utiliser une lettre comme 1^{er} caractère, et de ne pas utiliser d'espaces, ainsi que les points ou les virgules pour éviter les problèmes de changement de noms automatiques avec XCMS.

- **Colonne 2 : « class »**

Cette colonne définit l'échantillon. Elle distingue les échantillons (sample), les QC (pool), les blancs (blank), etc.

- **Colonne 3 : « sampleType »**

Cette colonne est pratiquement la même que la colonne précédente, elle est très utile pour la représentation graphique « quality metrics » de W4M. Elle permet d'associer une couleur à un groupe d'échantillon sur cette représentation graphique. Il est aussi possible de rentrer plus spécifiquement dans le détail en utilisant des dénominations plus précises telles que sample, blank, pool1, pool2, pool4, pool8, pool, etc.

- **Colonne 4 : « batch »**

Correspond au batch analytique de l'échantillon en notant B1, B2, B3, etc. Lors de cette thèse, pour des soucis de variabilité, tous les échantillons ont été analysés sur le même réplica analytique, ainsi B1 a été utilisé pour chaque échantillon.

- **Colonne 5 : « batchcell »**

Indique le répliquat biologique de chaque échantillon, on note par exemple m1, m2 ou m3 lorsqu'il y a trois réplica biologiques différents.

- **Colonne 6 : « Factor »**

Cette colonne indique la condition biologique de l'échantillon, cette condition varie en fonction de l'expérience réalisée, on peut marquer par exemple « PFOA » ou « blanc » pour les échantillons correspondants.

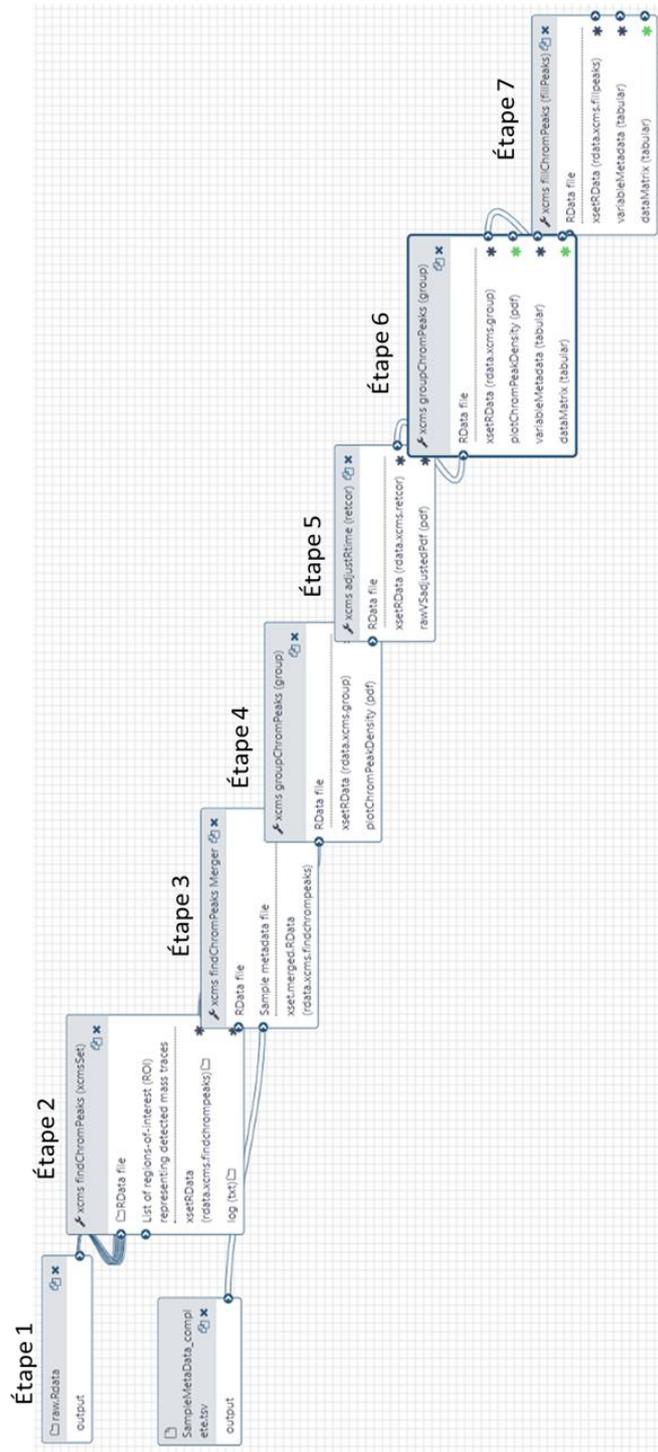
- **Colonne 7 : « injectionOrder »**

Cette colonne indique l'ordre d'injection des échantillons dans l'appareil de mesure. Cette colonne est très importante pour les corrections de type LOESS (locally weighted smoothing) de dérive du signal analytique au cours du temps. Pour des facilités d'incorporation dans le tableau, il est conseillé d'ajouter l'ordre d'injection dans le nom de l'échantillon après randomisation de la séquence.

Il est aussi possible d'ajouter des colonnes supplémentaires afin de mieux caractériser les échantillons en renseignant, par exemple, le temps d'exposition ou d'autres conditions.

- **Lancement de XCMS**

Tout d'abord, les fichiers .raw générés par l'appareil de mesure ont été convertis avec le logiciel MSconvert en .mzml qui est un des formats de lecture de XCMS. La stratégie de traitement des données mise en œuvre par XCMS combine plusieurs étapes regroupées dans un workflow et représentées dans la figure ci-dessous.



Étapes du workflow de génération de données utilisé sur W4M lors de cette thèse

Etape 1 : ReadMSData

Le premier package charge les données pour que XCMS puisse lire les fichiers, il n'y a pas de paramètre spécifique à régler lors de cette étape.

Etape 2 : Findchrompeaks

Cette étape permet la détection, l'extraction des pics avec une correction de la ligne de base, indépendamment pour chaque échantillon.

Etape 3: Findchrompeaks merger

Cette étape permet d'incorporer la samplometadata créée précédemment pour l'intégration des pics détectés. Elle permet de fusionner l'ensemble des échantillons introduit dans W4M en un seul fichier.

Etape 4 : Groupchrompeaks

Cette étape va permettre d'apparier les pics précédemment détectés pour chaque échantillon avec un temps de rétention et une masse pour chaque échantillon. L'algorithme calcule donc la répartition des pics chromatographiques et identifie les régions où les pics d'une masse identique ont un temps de rétention similaires.

Etape 5 : AdjustRTTime

Permet de corriger les variations dans les temps de rétention des variables pouvant survenir en SDM sur de longues séquences.

Etape 6 : Groupchrompeaks

Etape identique à l'étape 4, permettant d'associer à nouveau les pics qui ont été alignés lors de l'étape 5.

Etape 7 : Fillchrompeaks

Cette étape remplace les valeurs non attribuées par des valeurs de la ligne de base proche de 0 dans le tableau de données. L'étape permet aussi de

générer la datamatrix et la variablemetadata regroupant l'ensemble des informations.

Ensemble des paramètres utilisés lors de cette thèse pour chaque étape de la génération de donnée de l'algorithme XCMS.

	Paramètres utilisés
Étape 1	
Étape 2	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Extraction method</i> → Centwave - <i>Max tolerated ppm m/z deviation in consecutive scans in ppm</i> → 5 - <i>Min, Max peaks width</i> → 10,50 - <i>Signal to noise ratio</i> → 5 - <i>Prefilter step</i> → 10,1000 (10 représente le nb de scan successif où un pic apparait pour être conservé, 1000 est la valeur du bruit de fond de l'appareil de mesure) - <i>Name of the function to calculate the m/z center of the chromatographic peak</i> → intensity weighted mean of the peak's m/z value - <i>Integration method</i> → peak limit are found through descent of the Mexican hat filtered data - <i>Minimum difference in m/z for peaks with overlapping retention times</i> → 0.01 - <i>Fitgauss</i> → no - <i>Noise filter</i> → 1000 - <i>verbose Columns</i> → no
Étape 3	
Étape 4	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Method to use for grouping</i> → peakdensity - <i>Bandwidth</i> → 10, estime la largeur des bandes d'intégrations détectant les pics. - <i>Minimum fraction of samples</i> → 0.5, (cette donnée est très importante. Elle permet d'intégrer un pic en fonction de sa redondance dans les échantillons. En réglant sur 0.5 il faut qu'un pic soit présent dans 50 % d'un même groupe de la colonne 2 de la samplemetadata pour être intégré, ce qui réduit fortement les taux de faux positif). - <i>Minimum number of samples</i> → 1 - <i>Width of overlapping m/z slices</i> → 0.01 - <i>Maximum number of groups to identify in a single m/z slice</i> → 50

Étape 5	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Method to use for retention time correction → peakgroups</i> - <i>Minimum required fraction of samples in which peaks for the peak group were identified → 0.8</i> - <i>Maximal number of additional peaks for all samples to be assigned to a peak group for retention time correction → 1</i> - <i>Smooth method → LOESS</i> - <i>Degree of smoothing for the loess fitting → 0.2</i> - <i>Family → gaussian</i>
Étape 6	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Method to use for grouping → peakdensity</i> - <i>Bandwidth → 5, (moins large que pour l'étape 4, car les pics ont été alignés à l'étape 5)</i> - <i>Minimum fraction of samples → 0.5</i> - <i>Minimum number of samples → 1</i> - <i>Width of overlapping m/z slices → 0.01</i> - <i>Maximum number of groups to identify in a single m/z slice → 50</i>
Étape 7	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Convert retention time (seconds) into minutes → no</i> - <i>Number of decimal places for mass values reported in ions' identifiers → 4</i> - <i>Number of decimal places for retention time values reported in ions' identifiers → 0</i> - <i>Reported intensity values → into</i> - <i>Replace the remain NA by 0 in the dataMatrix → yes</i>

- **Les étapes de filtration**

Filtre 1 : filtre Bio/BLC.

Ce filtre permet d'éliminer toutes les variables présentes en trop forte intensité dans les blancs des échantillons. Dans les analyses métabolomiques réalisées lors de cette thèse, l'ensemble des variables ayant une valeur d'intégration 2 fois supérieure dans les échantillons par rapport aux valeurs obtenues dans les blancs ont été conservées.

Filtre 2 : filtre par rapport aux coefficients de corrélation dans les QC dilués.

Cette filtration permet d'éliminer les pics artefacts pouvant être générés dans les échantillons. Pour cela, une dilution des QC est réalisée

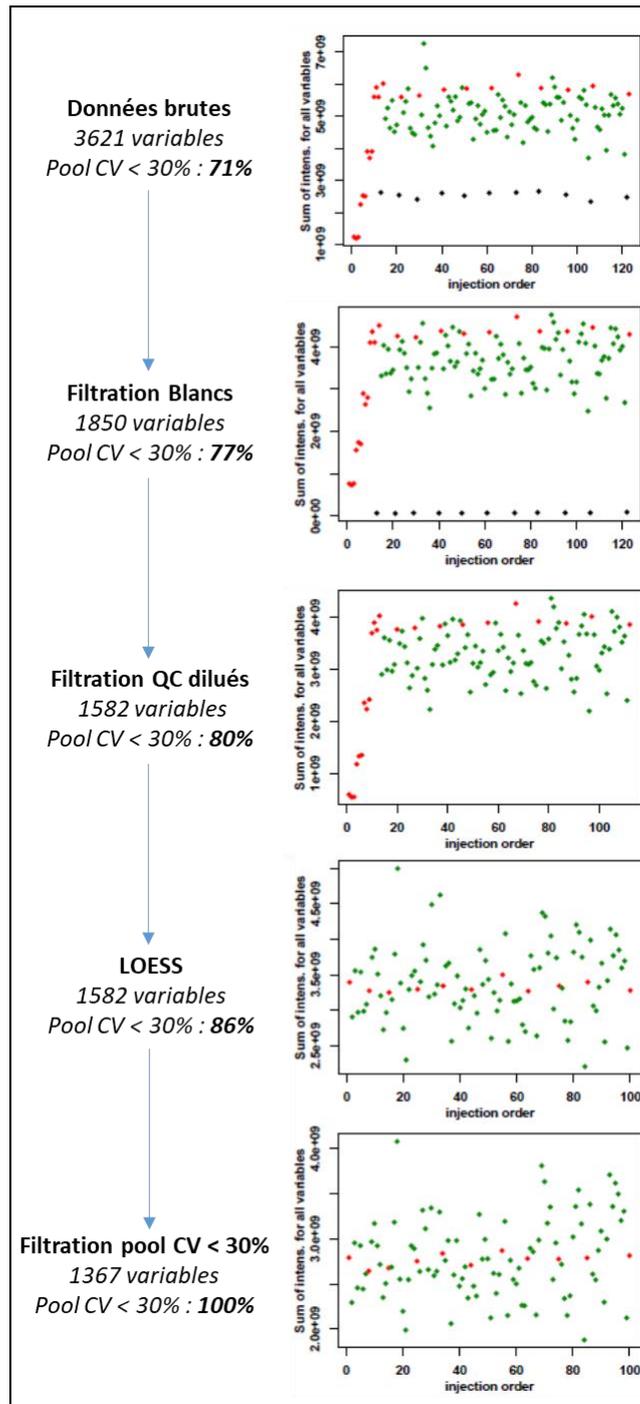
afin d'obtenir des coefficients de corrélation pour chaque variable. Cela permet d'observer une cohérence dans le comportement de l'aire des variables avec une dilution. Dans les analyses métabolomiques réalisées lors de cette thèse, les QC ont été dilués par 2, 4 et 8. Un coefficient de corrélation (R^2) supérieur à 0,7 a permis de sélectionner les variables pour la suite des filtrations.

Filtre 3 : LOESS.

Plusieurs méthodes de normalisation peuvent être utilisées dans de cas d'analyse de jeux de données non ciblée en métabolomique. Ce filtre ne supprime pas de variables, il permet de d'améliorer la variabilité observée sur de nombreuses variables. Dans le cadre de cette thèse, la LOESS a été utilisée, c'est une stratégie de normalisation reposant sur la mesure d'un échantillon QC injecté périodiquement. Pour chaque variable détectée, un modèle de régression est ajusté aux valeurs du pool et est utilisé ensuite pour ajuster les intensités des échantillons d'intérêt. Cette procédure permet de fortement diminuer la perte de signal intervenant en spectrométrie de masse lors de longue séquence analytique.

Filtre 4 : filtre pool CV.

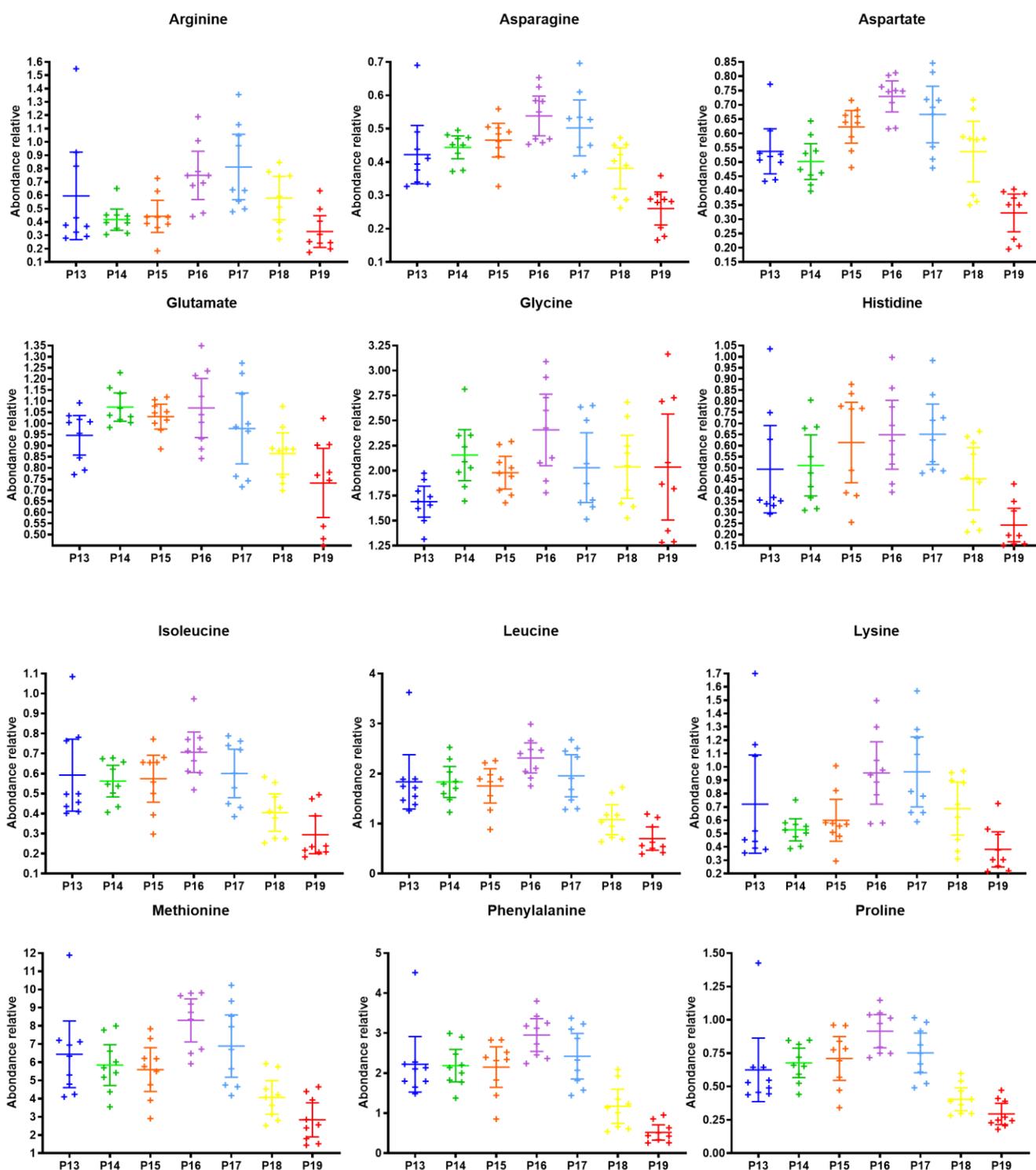
Ce filtre permet de supprimer les variables ayant un coefficient de variation supérieur à 30 % en se basant sur les QC. En effet, une variable ayant une forte variabilité dans l'échantillon QC qui est le même analysé tout au long de la séquence analytique est anormale. C'est pourquoi, l'ensemble des variables ayant un coefficient de variation supérieure à 30 % ont ainsi été supprimées au cours de ce travail.

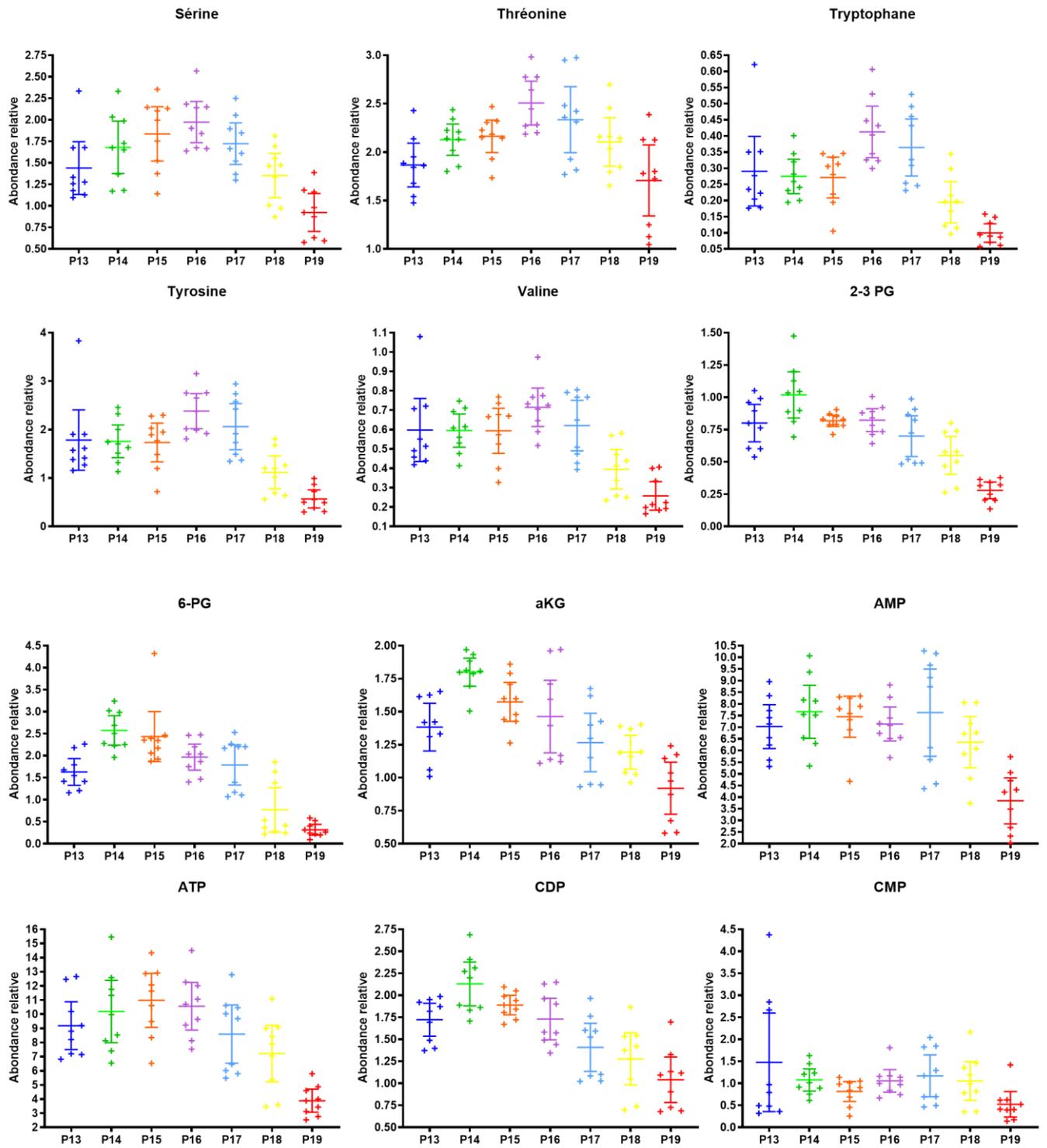


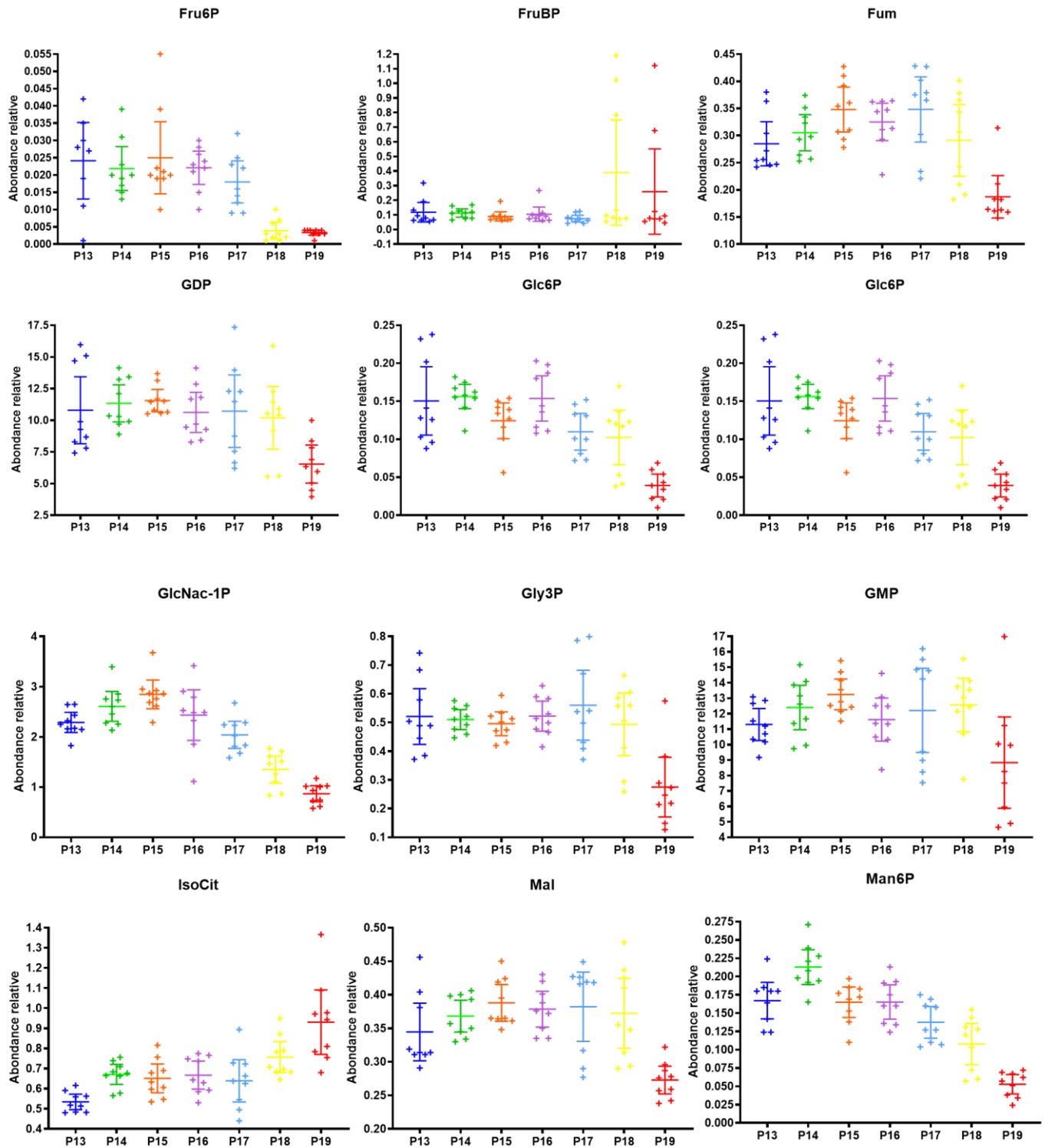
Étapes successives de filtration des données brutes obtenues par le logiciel XCMS. Une représentation des données par l'outil « quality metrics » de W4M a été utilisé pour chaque étape. Sur les graphiques, l'abscisse représente l'ordre d'injection des échantillons et l'ordonnée la somme des intégrations de chaque variable obtenue pour un échantillon. Les points verts représentent les échantillons, les points rouges les QC et QC dilués et les points noirs les échantillons blancs sans cellule.

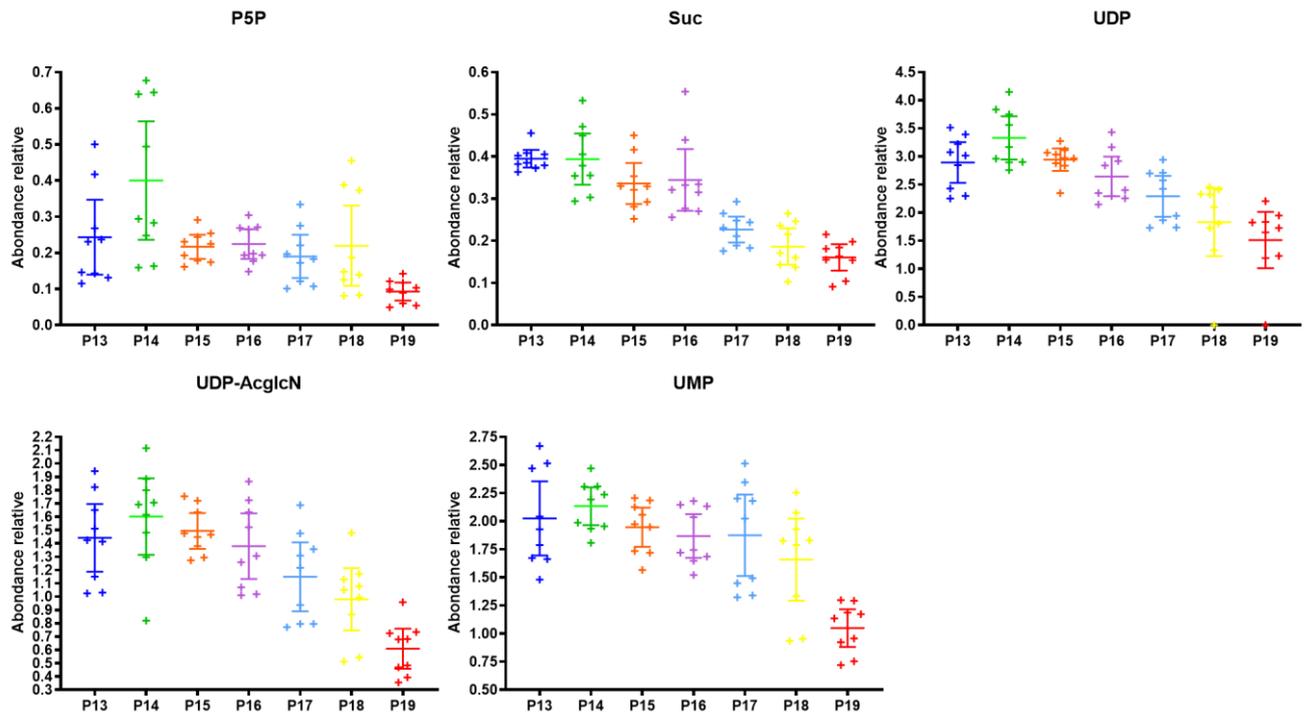
➤ **Annexe 3 : Effet du passage cellulaire pour l'ensemble des métabolites polaires obtenus sur la lignée cellulaire HepaRG sur 7 passages successifs.**

Une ANOVA à un facteur suivi d'un test post hoc de Tukey a été réalisée afin de mettre en évidence un effet du passage cellulaire entre chaque passage deux à deux (n=9) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).









Comparaison	Arginine	Asparagine	Aspartate	Glutamate	Glycine	Histidine	Isoleucine	Leucine	Lysine	Methionine	Phénylalanine	Proline	Sérine	Thréonine	Tryptophane	Tyrosine	Valine
P13 vs. P14	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
P13 vs. P15	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
P13 vs. P16	ns	ns	**	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	**	ns	ns	ns
P13 vs. P17	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
P13 vs. P18	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns
P13 vs. P19	ns	**	***	*	ns	ns	**	***	ns	***	***	**	*	ns	**	***	***
P14 vs. P15	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
P14 vs. P16	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns
P14 vs. P17	*	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
P14 vs. P18	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	*	ns	ns	ns	ns	ns
P14 vs. P19	ns	***	**	***	ns	ns	**	***	ns	**	***	**	***	ns	**	***	***
P15 vs. P16	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns
P15 vs. P17	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
P15 vs. P18	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	ns	ns	ns	ns	ns
P15 vs. P19	ns	***	***	**	ns	**	**	***	ns	*	***	***	***	ns	**	***	***
P16 vs. P17	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
P16 vs. P18	ns	**	**	ns	ns	ns	**	***	ns	***	***	***	**	ns	***	***	***
P16 vs. P19	*	***	***	***	ns	***	***	***	**	***	***	***	***	***	***	***	***
P17 vs. P18	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	*	**	**	ns	ns	**	**	*
P17 vs. P19	**	***	***	*	ns	***	**	***	**	***	***	***	***	**	***	***	***
P18 vs. P19	ns	*	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Comparison	2-3 PG	6-PG	aKG	AMP	ATP	CDP	CMP	CTP	Fru6P	FruBP	Fum	GDP	Glc6P	GlcNac-1P	Gly3P	GMP	IsoCit
P13 vs. P14	ns	**	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
P13 vs. P15	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns						
P13 vs. P16	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
P13 vs. P17	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
P13 vs. P18	*	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	***	ns	ns	ns	ns	***	ns	ns	**
P13 vs. P19	***	***	**	***	***	***	ns	***	***	ns	*	*	***	***	***	ns	***
P14 vs. P15	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
P14 vs. P16	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
P14 vs. P17	**	*	***	ns	ns	***	ns	***	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns
P14 vs. P18	***	***	***	ns	ns	***	ns	***	***	ns	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns
P14 vs. P19	***	***	***	***	***	***	ns	***	***	ns	**	**	***	***	***	*	***
P15 vs. P16	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
P15 vs. P17	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns
P15 vs. P18	*	***	*	ns	*	**	ns	***	***	ns	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns
P15 vs. P19	***	***	***	***	***	***	ns	***	***	ns	***	**	***	***	**	**	***
P16 vs. P17	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
P16 vs. P18	*	***	ns	ns	ns	*	ns	*	***	ns	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns
P16 vs. P19	***	***	***	***	***	***	ns	***	***	ns	***	*	***	***	***	ns	***
P17 vs. P18	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns
P17 vs. P19	***	***	ns	***	**	ns	ns	*	*	ns	***	*	**	***	***	ns	***
P18 vs. P19	*	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	*	ns	**	*	*

Comparison	Mal	Man6P	P5P	Suc	UDP	UDP-AgIcIN	UMP
P13 vs. P14	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns
P13 vs. P15	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
P13 vs. P16	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
P13 vs. P17	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns
P13 vs. P18	ns	**	ns	***	**	*	ns
P13 vs. P19	*	***	ns	***	***	***	***
P14 vs. P15	ns	*	*	ns	ns	ns	ns
P14 vs. P16	ns	*	*	ns	ns	ns	ns
P14 vs. P17	ns	***	**	***	**	*	ns
P14 vs. P18	ns	***	*	***	***	***	ns
P14 vs. P19	**	***	***	***	***	***	***
P15 vs. P16	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
P15 vs. P17	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns
P15 vs. P18	ns	**	ns	***	***	*	ns
P15 vs. P19	***	***	ns	***	***	***	***
P16 vs. P17	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns
P16 vs. P18	ns	**	ns	***	*	ns	ns
P16 vs. P19	***	***	ns	***	***	***	***
P17 vs. P18	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
P17 vs. P19	***	***	ns	ns	*	**	***
P18 vs. P19	**	**	ns	ns	ns	ns	**

➤ **Annexe 4 : Ensembles des résultats obtenus en métabolomique ciblée sur les lipides après 1 jour d'exposition au PFOA.**

L'effet du PFOA a été testé, pour chaque métabolite (n=18), par une ANOVA à un facteur suivi d'un test de Tukey (p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001). Les flèches entre parenthèses indiquent le sens de variation observé du métabolite dans les cellules exposées au PFOA par rapport aux cellules contrôle. Triglycérides (TG), céramides (Cer), phosphatidyléthanolamine (PE), sphingomyélines (SM), phosphatidylinositols (PI), phosphatidylcholines (PC).*

Métabolites	Résultat ANOVA	DMSO vs 0,001 µM	DMSO vs 0,1 µM	DMSO vs 10 µM
PC (28a:0)	ns			
PC (30a:0)	ns			
PC (30a:1)	*	ns	* (↘)	* (↘)
PC (32a:0)	ns			
PC (32a:1)	*	ns	* (↘)	* (↘)
PC (32a:2)	*	ns	* (↘)	ns
PC (34a:0)	ns			
PC (34a:1)	*	ns	* (↘)	* (↘)
PC (34a:2)	**	ns	* (↘)	** (↘)
PC (34a:3)	*	ns	* (↘)	* (↘)
PC (36a:1)	*	ns	ns	* (↘)
PC (36a:2)	*	ns	* (↘)	* (↘)
PC (36a:3)	*	ns	* (↘)	* (↘)
PC (36a:4)	*	ns	* (↘)	* (↘)
PC (38a:2)	ns			
PC (38a:3)	*	ns	* (↘)	* (↘)
PC (38a:4)	*	ns	* (↘)	* (↘)

PC (38a:5)	*	ns	* (↘)	* (↘)
PC (38a:6)	*	ns	* (↘)	* (↘)
PC (40a:3)	*	ns	* (↘)	ns
PC (40a:6)	*	ns	* (↘)	ns
PI (32:1)	ns			
PI (34:1)	ns			
PI (34:2)	ns			
PI (36:0)	ns			
PI (36:1)	ns			
PI (36:2)	ns			
PI (36:3)	ns			
PI (38:1)	ns			
PI (38:2)	ns			
PI (38:3)	ns			
PI (38:4)	ns			
PI (40:2)	ns			
PI (40:3)	ns			
PI (40:4)	ns			
PI (40:5)	ns			
PI (40:6)	ns			
PE (32a:0)	*	* (↘)	ns	ns
PE (32a:1)	*	* (↘)	ns	ns
PE (32a:2)	***	*** (↘)	** (↘)	** (↘)

PE (34a:0)	**	*** (↘)	ns	* (↘)
PE (34a:1)	***	*** (↘)	* (↘)	** (↘)
PE (36a:1)	***	*** (↘)	* (↘)	* (↘)
PE (36a:2)	***	*** (↘)	** (↘)	** (↘)
PE (36a:3)	***	*** (↘)	* (↘)	** (↘)
PE (36a:4)	***	*** (↘)	* (↘)	*** (↘)
PE (38a:2)	***	*** (↘)	* (↘)	** (↘)
PE (38a:3)	***	*** (↘)	* (↘)	** (↘)
PE (38a:4)	***	*** (↘)	** (↘)	*** (↘)
PE (38a:5)	***	*** (↘)	** (↘)	** (↘)
PE (38a:6)	***	*** (↘)	** (↘)	** (↘)
PE (40a:3)	***	*** (↘)	* (↘)	** (↘)
PE (40a:5)	***	*** (↘)	** (↘)	** (↘)
PE (40a:6)	***	*** (↘)	* (↘)	** (↘)
PE (40a:7)	***	*** (↘)	** (↘)	*** (↘)
Cer (d18:1/16:0)	**	** (↘)	ns	* (↘)
Cer (d18:1/16:1)	**	* (↘)	* (↘)	* (↘)
Cer (d18:1/18:0)	*	ns	ns	* (↘)
Cer (d18:1/18:1)	**	** (↘)	* (↘)	* (↘)
Cer (d18:1/20:0)	ns			
Cer (d18:1/22:0)	ns			
Cer (d18:1/24:0)	ns			
Cer (d18:1/24:1)	ns			

Cer (d18:1/26:0)	ns			
Cer (d18:1/26:1)	ns			
SM (d18:1/14:0)	**	** (↘)	** (↘)	ns
SM (d18:1/16:0)	*	** (↘)	ns	ns
SM (d18:1/16:1)	**	** (↘)	** (↘)	* (↘)
SM (d18:1/18:0)	*	* (↘)	ns	ns
SM (d18:1/18:1)	**	** (↘)	** (↘)	* (↘)
SM (d18:1/20:0)	*	* (↘)	ns	ns
SM (d18:1/20:1)	**	* (↘)	* (↘)	ns
SM (d18:1/22:0)	ns			
SM (d18:1/22:1)	*	* (↘)	ns	ns
SM (d18:1/24:0)	ns			
SM (d18:1/24:1)	ns			
Cholestérol	***	*** (↘)	** (↘)	** (↘)
TAG (48:0)	ns			
TAG (50:0)	ns			
TAG (52:0)	ns			
TAG (54:0)	ns			
TAG (56:0)	ns			

➤ **Annexe 5 : Ensembles des résultats obtenus en métabolomique ciblée sur les métabolites polaires et lipides après 28 jours d'exposition au PFOA.**

Métabolites	Résultat ANOVA	DMSO vs 0,001 µM	DMSO vs 0,1 µM	DMSO vs 10 µM
Alanine	*	ns	ns	ns
Arginine	ns			
Asparagine	ns			
Aspartate	***	ns	ns	* (↗)
Glutamate	ns			
Glutamine	ns			
Glycine	ns			
Histidine	*	ns	ns	ns
Isoleucine	ns			
Leucine	ns			
Lysine	ns			
Méthionine	ns			
Phénylalanine	ns			
Proline	*	ns	ns	ns
Sérine	ns			
Thréonine	ns			
Tryptophane	ns			
Tyrosine	ns			
Valine	**	ns	ns	ns
2,3 bisphosphoglycérate	ns			
6 phosphogluconate	*	ns	ns	ns

Alpha cétooglutarate	***	ns	ns	*** (↗)
Adénosine monophosphate	ns			
Cytidine diphosphate	ns			
Cytidine monophosphate	ns			
N Acétylglucosamine 1 phosphate	ns			
N Acétylglucosamine 6 phosphate	ns			
Fructose 6 phosphate	ns			
Fructose 1 phosphate	ns			
Fructose bisphosphate	ns			
Glucose 6 phosphate	ns			
Glucose 1 phosphate	ns			
Glycérol 3 Phosphate	ns			
Guanosine monophosphate	ns			
Phosphoénolpyruvate	ns			
Uridine diphosphate	ns			
Adénosine diphosphate	ns			
Adénosine triphosphate	ns			
Cytidine triphosphate	ns			
Phosphosérine	ns			
Sédoheptulose 7 phosphate	ns			
Uridine diphosphate N-acétylglucosamine	ns			
Uridine diphosphate glucose	ns			
Uridine monophosphate	ns			
Uridine triphosphate	ns			
Guanosine diphosphate	ns			

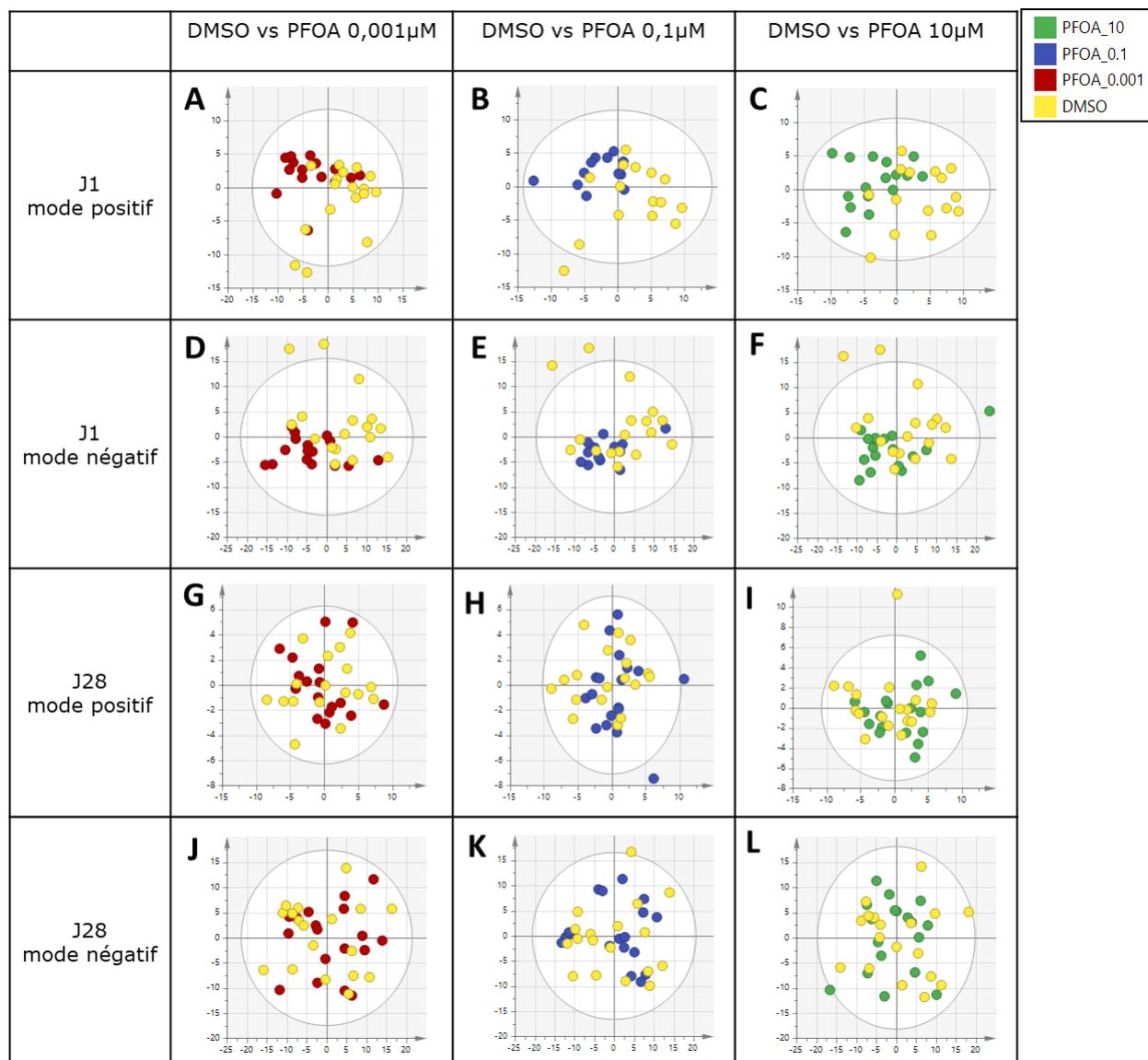
Malate	***	ns	ns	*** (↗)
Citrate	**	ns	ns	** (↗)
Fumarate	***	ns	ns	*** (↗)
Mannose 6 phosphate	ns			
PC (28a:0)	ns			
PC (30a:0)	ns			
PC (30a:1)	ns			
PC (32a:0)	ns			
PC (32a:1)	ns			
PC (32a:2)	ns			
PC (34a:0)	ns			
PC (34a:1)	ns			
PC (34a:2)	ns			
PC (34a:3)	ns			
PC (36a:1)	ns			
PC (36a:2)	ns			
PC (36a:3)	ns			
PC (36a:4)	ns			
PC (38a:2)	ns			
PC (38a:3)	ns			
PC (38a:4)	ns			
PC (38a:5)	ns			

PC (38a:6)	ns			
PC (40a:3)	ns			
PC (40a:6)	ns			
PI (32:1)	*	ns	ns	ns
PI (34:1)	ns			
PI (34:2)	*	ns	ns	ns
PI (36:0)	ns			
PI (36:1)	*	ns	ns	ns
PI (36:2)	ns			
PI (36:3)	ns			
PI (38:1)	ns			
PI (38:2)	ns			
PI (38:3)	ns			
PI (38:4)	ns			
PI (40:2)	ns			
PI (40:3)	ns			
PI (40:4)	ns			
PI (40:5)	*	ns	ns	ns
PI (40:6)	ns			
PE (32a:0)	***	ns	ns	ns
PE (32a:1)	***	ns	ns	ns
PE (32a:2)	***	ns	ns	** (↗)

PE (34a:0)	*	ns	ns	ns
PE (34a:1)	*	ns	ns	ns
PE (36a:1)	ns			
PE (36a:2)	ns			
PE (36a:3)	*	ns	ns	ns
PE (36a:4)	*	ns	ns	ns
PE (38a:2)	ns			
PE (38a:3)	ns			
PE (38a:4)	ns			
PE (38a:5)	*	ns	ns	ns
PE (38a:6)	ns			
PE (40a:3)	ns			
PE (40a:5)	*	ns	ns	ns
PE (40a:6)	**	ns	ns	ns
PE (40a:7)	**	ns	ns	ns
Cer (d18:1/16:0)	ns			
Cer (d18:1/16:1)	ns			
Cer (d18:1/18:0)	ns			
Cer (d18:1/18:1)	ns			
Cer (d18:1/20:0)	ns			
Cer (d18:1/22:0)	ns			
Cer (d18:1/24:0)	ns			

Cer (d18:1/24:1)	ns			
Cer (d18:1/26:0)	ns			
Cer (d18:1/26:1)	ns			
SM (d18:1/14:0)	ns			
SM (d18:1/16:0)	ns			
SM (d18:1/16:1)	ns			
SM (d18:1/18:0)	ns			
SM (d18:1/18:1)	ns			
SM (d18:1/20:0)	ns			
SM (d18:1/20:1)	ns			
SM (d18:1/22:0)	ns			
SM (d18:1/22:1)	ns			
SM (d18:1/24:0)	ns			
SM (d18:1/24:1)	ns			
Cholestérol	ns			
TAG (48:0)	ns			
TAG (50:0)	ns			
TAG (52:0)	ns			
TAG (54:0)	ns			
TAG (56:0)	ns			

➤ **Annexe 6 : Analyses en composantes principales réalisées sur les analyses métabolomiques non ciblées entre le contrôle négatif et les différentes concentrations en PFOA.**



Ensemble des analyses statistiques ACP réalisées pour les analyses métabolomiques non ciblées entre le contrôle négatif (DMSO) et les différentes concentrations en PFOA. L'ensemble des paramètres obtenus pour chaque ACP ont été résumés ci-dessous.

	R2X(1)	R2X(2)
A	0,235	0,139
B	0,22	0,142
C	0,228	0,129
D	0,301	0,156
E	0,258	0,154
F	0,288	0,151
G	0,35	0,118
H	0,256	0,122
I	0,311	0,14
J	0,267	0,176
K	0,234	0,152
L	0,216	0,182

Références

- 3M (2007) Remedial Investigation Report. 166
- Acharjee A, Ament Z, West JA, et al (2016) Integration of metabolomics, lipidomics and clinical data using a machine learning method. *BMC Bioinformatics* 17:440. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-1292-2>
- Adam AAA, Jongejan A, Moerland PD, et al (2020) Genome-wide expression profiling reveals increased stability and mitochondrial energy metabolism of the human liver cell line HepaRG-CAR. *Cytotechnology* 72:377–395. <https://doi.org/10.1007/s10616-020-00384-w>
- Alabduladhem TO, Bordoni B (2020) Physiology, Krebs Cycle. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL)
- Aldana J, Romero-Otero A, Cala MP (2020) Exploring the Lipidome: Current Lipid Extraction Techniques for Mass Spectrometry Analysis. *Metabolites* 10:. <https://doi.org/10.3390/metabo10060231>
- Almazroo OA, Miah MK, Venkataramanan R (2017) Drug Metabolism in the Liver. *Clinics in Liver Disease* 21:1–20. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2016.08.001>
- Alonso A, Marsal S, Julià A (2015) Analytical Methods in Untargeted Metabolomics: State of the Art in 2015. *Front Bioeng Biotechnol* 3:. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00023>
- Aninat C, Piton A, Glaise D, et al (2006) Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos* 34:75–83. <https://doi.org/10.1124/dmd.105.006759>
- ANSES (2017) Composés perfluorés : une première campagne nationale de mesure dans les eaux | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. <https://www.anses.fr/fr/content/compos%C3%A9s-perfluor%C3%A9s-une-premi%C3%A8re-campagne-nationale-de-mesure-dans-les-eaux>. Accessed 25 Aug 2020
- Anthérieu S, Chesné C, Li R, et al (2010) Stable expression, activity, and inducibility of cytochromes P450 in differentiated HepaRG cells. *Drug Metab Dispos* 38:516–525. <https://doi.org/10.1124/dmd.109.030197>
- Anthérieu S, Rogue A, Fromenty B, et al (2011) Induction of vesicular steatosis by amiodarone and tetracycline is associated with up-regulation of lipogenic genes in heparg cells. *Hepatology* 53:1895–1905. <https://doi.org/10.1002/hep.24290>
- Arense P, Bernal V, Iborra JL, Cánovas M (2010) Metabolic adaptation of Escherichia coli to long-term exposure to salt stress. *Process Biochemistry* 45:1459–1467. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.05.022>
- Aurich MK, Paglia G, Rolfsson Ó, et al (2015) Prediction of intracellular metabolic states from extracellular metabolomic data. *Metabolomics* 11:603–619. <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0721-3>

- Bach C, X D, V B, et al (2017) The impact of two fluoropolymer manufacturing facilities on downstream contamination of a river and drinking water resources with per- and polyfluoroalkyl substances. In: Environmental science and pollution research international. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27988902/>. Accessed 25 Aug 2020
- Baillie TA, Rettie AE (2011) Role of Biotransformation in Drug-Induced Toxicity: Influence of Intra- and Inter-Species Differences in Drug Metabolism. *Drug Metab Pharmacokinet* 26:15–29
- Barber JL, Berger U, Chaemfa C, et al (2007) Analysis of per- and polyfluorinated alkyl substances in air samples from Northwest Europe. *J Environ Monit* 9:530–541. <https://doi.org/10.1039/b701417a>
- Bastin J, Djouadi F (2019) Anomalies de la β -oxydation mitochondriale des acides gras - Maladies rares et maladies communes. *Med Sci (Paris)* 35:779–786. <https://doi.org/10.1051/medsci/2019156>
- Bazzani S (2014) Promise and Reality in the Expanding Field of Network Interaction Analysis: Metabolic Networks. *Bioinform Biol Insights* 8:83–91. <https://doi.org/10.4137/BBI.S12466>
- Beggs KM, McGreal SR, McCarthy A, et al (2016) The Role of Hepatocyte Nuclear Factor 4-Alpha in Perfluorooctanoic Acid- and Perfluorooctanesulfonic Acid-Induced Hepatocellular Dysfunction. *Toxicol Appl Pharmacol* 304:18–29. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.05.001>
- Begley TH, White K, Honigfort P, et al (2005) Perfluorochemicals: potential sources of and migration from food packaging. *Food Addit Contam* 22:1023–1031. <https://doi.org/10.1080/02652030500183474>
- Behr A-C, Kwiatkowski A, Ståhlman M, et al (2020) Impairment of bile acid metabolism by perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) in human HepaRG hepatoma cells. *Arch Toxicol*. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02732-3>
- Bennett BD, Yuan J, Kimball EH, Rabinowitz JD (2008) Absolute quantitation of intracellular metabolite concentrations by an isotope ratio-based approach. *Nat Protoc* 3:1299–1311. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.107>
- Benskin JP, De Silva AO, Martin LJ, et al (2009) Disposition of perfluorinated acid isomers in Sprague-Dawley rats; part 1: single dose. *Environ Toxicol Chem* 28:542–554. <https://doi.org/10.1897/08-239.1>
- Bi H, Krausz KW, Manna SK, et al (2013) Optimization of harvesting, extraction, and analytical protocols for UPLC-ESI-MS-based metabolomic analysis of adherent mammalian cancer cells. *Anal Bioanal Chem* 405:5279–5289. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6927-9>
- Bingol K, Bruschweiler-Li L, Li D, et al (2016) Emerging new strategies for successful metabolite identification in metabolomics. *Bioanalysis* 8:557–573. <https://doi.org/10.4155/bio-2015-0004>

- Biopredic International HepaRG - Differentiated HepaRG cells - HPR116. <https://www.heparg.com/rubrique-differentiated-heparg-cells-hpr116>. Accessed 24 Nov 2020
- Bjork JA, Butenhoff JL, Wallace KB (2011) Multiplicity of nuclear receptor activation by PFOA and PFOS in primary human and rodent hepatocytes. *Toxicology* 288:8–17. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.06.012>
- Bjork JA, Wallace KB (2009) Structure-activity relationships and human relevance for perfluoroalkyl acid-induced transcriptional activation of peroxisome proliferation in liver cell cultures. *Toxicol Sci* 111:89–99. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp093>
- Boiteux V, Dauchy X, Rosin C, Munoz J-F (2012) National screening study on 10 perfluorinated compounds in raw and treated tap water in France. *Arch Environ Contam Toxicol* 63:1–12. <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9754-7>
- Bolten CJ, Kiefer P, Letisse F, et al (2007) Sampling for Metabolome Analysis of Microorganisms. *Anal Chem* 79:3843–3849. <https://doi.org/10.1021/ac0623888>
- Boronow KE, Brody JG, Schaidler LA, et al (2019) Serum concentrations of PFASs and exposure-related behaviors in African American and non-Hispanic white women. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 29:206–217. <https://doi.org/10.1038/s41370-018-0109-y>
- Bothwell JHF, Griffin JL (2011) An introduction to biological nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biol Rev Camb Philos Soc* 86:493–510. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00157.x>
- Boulanger B, Vargo J, Schnoor JL, Hornbuckle KC (2004) Detection of perfluorooctane surfactants in Great Lakes water. *Environ Sci Technol* 38:4064–4070. <https://doi.org/10.1021/es0496975>
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Briske-Anderson MJ, Finley JW, Newman SM (1997) The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 214:248–257. <https://doi.org/10.3181/00379727-214-44093>
- Brunk E, Sahoo S, Zielinski DC, et al (2018) Recon3D enables a three-dimensional view of gene variation in human metabolism. *Nat Biotechnol* 36:272–281. <https://doi.org/10.1038/nbt.4072>
- Bucher S, Jalili P, Le Guillou D, et al (2017) Bisphenol a induces steatosis in HepaRG cells using a model of perinatal exposure. *Environ Toxicol* 32:1024–1036. <https://doi.org/10.1002/tox.22301>
- Buck RC, Franklin J, Berger U, et al (2011) Perfluoroalkyl and Polyfluoroalkyl Substances in the Environment: Terminology, Classification, and Origins. *Integr Environ Assess Manag* 7:513–541. <https://doi.org/10.1002/ieam.258>

- Buck RC, Murphy PM, Pabon M (2012) Chemistry, Properties, and Uses of Commercial Fluorinated Surfactants. In: Knepper TP, Lange FT (eds) Polyfluorinated Chemicals and Transformation Products. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 1–24
- Buhrke T, Krüger E, Pevny S, et al (2015) Perfluorooctanoic acid (PFOA) affects distinct molecular signalling pathways in human primary hepatocytes. *Toxicology* 333:53–62. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.04.004>
- Butenhoff JL, Kennedy GL, Hinderliter PM, et al (2004) Pharmacokinetics of perfluorooctanoate in cynomolgus monkeys. *Toxicol Sci* 82:394–406. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh302>
- Cabaton NJ, Canlet C, Wadia PR, et al (2013) Effects of Low Doses of Bisphenol A on the Metabolome of Perinatally Exposed CD-1 Mice. *Environ Health Perspect* 121:586–593. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205588>
- Cabaton NJ, Poupin N, Canlet C, et al (2018) An Untargeted Metabolomics Approach to Investigate the Metabolic Modulations of HepG2 Cells Exposed to Low Doses of Bisphenol A and 17 β -Estradiol. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9:. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00571>
- Cabaton NJ, Wadia PR, Rubin BS, et al (2011) Perinatal Exposure to Environmentally Relevant Levels of Bisphenol A Decreases Fertility and Fecundity in CD-1 Mice. *Environ Health Perspect* 119:547–552. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002559>
- Calafat AM, Kuklennyik Z, Reidy JA, et al (2007a) Serum concentrations of 11 polyfluoroalkyl compounds in the u.s. population: data from the national health and nutrition examination survey (NHANES). *Environ Sci Technol* 41:2237–2242. <https://doi.org/10.1021/es062686m>
- Calafat AM, Wong L-Y, Kuklennyik Z, et al (2007b) Polyfluoroalkyl chemicals in the U.S. population: data from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2004 and comparisons with NHANES 1999-2000. *Environ Health Perspect* 115:1596–1602. <https://doi.org/10.1289/ehp.10598>
- Calles K, Svensson I, Lindskog E, Haggström L (2006) Effects of conditioned medium factors and passage number on Sf9 cell physiology and productivity. *Biotechnol Prog* 22:394–400. <https://doi.org/10.1021/bp050297a>
- Cariou R, Veyrand B, Yamada A, et al (2015) Perfluoroalkyl acid (PFAA) levels and profiles in breast milk, maternal and cord serum of French women and their newborns. *Environ Int* 84:71–81. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.07.014>
- CDC (2018) National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals | CDC. <https://www.cdc.gov/exposurereport/index.html>. Accessed 26 Aug 2020
- Chachad SS, Gole M, Malhotra G, Naidu R (2014) Comparison of pharmacokinetics of two fenofibrate tablet formulations in healthy human subjects. *Clin Ther* 36:967–973. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2014.04.017>

- Chamorro-Garcia R, Diaz-Castillo C, Shoucri BM, et al (2017) Ancestral perinatal obesogen exposure results in a transgenerational thrifty phenotype in mice. *Nature Communications* 8:2012. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01944-z>
- Chang ET, Adami H-O, Boffetta P, et al (2014) A critical review of perfluorooctanoate and perfluorooctanesulfonate exposure and cancer risk in humans. *Crit Rev Toxicol* 44 Suppl 1:1–81. <https://doi.org/10.3109/10408444.2014.905767>
- Chang S-C, Das K, Ehresman DJ, et al (2008) Comparative pharmacokinetics of perfluorobutyrate in rats, mice, monkeys, and humans and relevance to human exposure via drinking water. *Toxicol Sci* 104:40–53. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn057>
- Chen S, Hoene M, Li J, et al (2013) Simultaneous extraction of metabolome and lipidome with methyl tert-butyl ether from a single small tissue sample for ultra-high performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1298:9–16. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.05.019>
- Cheng J, Fujimura M, Zhao W, Wang W (2013) Neurobehavioral effects, c-Fos/Jun expression and tissue distribution in rat offspring prenatally co-exposed to MeHg and PFOA: PFOA impairs Hg retention. *Chemosphere* 91:758–764. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.02.016>
- Clish CB (2015) Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine. *Cold Spring Harb Mol Case Stud* 1:. <https://doi.org/10.1101/mcs.a000588>
- Coman C, Solari FA, Hentschel A, et al (2016) Simultaneous Metabolite, Protein, Lipid Extraction (SIMPLEX): A Combinatorial Multimolecular Omics Approach for Systems Biology. *Mol Cell Proteomics* 15:1453–1466. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.053702>
- COP9 (2019) IISD/ENB @ BC COP-14 | RC COP-9 | SC COP-9 | 3 May 2019 | Geneva, Switzerland | IISD Reporting Services. <http://enb.iisd.org/chemical/cops/2019/3may.html>. Accessed 21 Sep 2020
- Cordner A, Rosa VYDL, Schaidler LA, et al (2019) Guideline levels for PFOA and PFOS in drinking water: the role of scientific uncertainty, risk assessment decisions, and social factors. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology* 29:157. <https://doi.org/10.1038/s41370-018-0099-9>
- Corton JC, Cunningham ML, Hummer BT, et al (2014) Mode of action framework analysis for receptor-mediated toxicity: The peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) as a case study. *Crit Rev Toxicol* 44:1–49. <https://doi.org/10.3109/10408444.2013.835784>
- Costa G, Sartori S, Consonni D (2009) Thirty years of medical surveillance in perfluorooctanoic acid production workers. *J Occup Environ Med* 51:364–372. <https://doi.org/10.1097/JOM.0b013e3181965d80>
- Cottret L, Frainay C, Chazalviel M, et al (2018) MetExplore: collaborative edition and exploration of metabolic networks. *Nucleic Acids Res* 46:W495–W502. <https://doi.org/10.1093/nar/gky301>

- Croyal M, Kaabia Z, León L, et al (2018) Fenofibrate decreases plasma ceramide in type 2 diabetes patients: A novel marker of CVD? *Diabetes Metab* 44:143–149. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2017.04.003>
- Cuperlović-Culf M, Barnett DA, Culf AS, Chute I (2010) Cell culture metabolomics: applications and future directions. *Drug Discov Today* 15:610–621. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.06.012>
- Cuykx M, Claes L, Rodrigues RM, et al (2018) Metabolomics profiling of steatosis progression in HepaRG® cells using sodium valproate. *Toxicol Lett* 286:22–30. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.12.015>
- Das KP, Wood CR, Lin MT, et al (2017) Perfluoroalkyl acids-induced liver steatosis: Effects on genes controlling lipid homeostasis. *Toxicology* 378:37–52. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.12.007>
- De Silva AO, Spencer C, Scott BF, et al (2011) Detection of a cyclic perfluorinated acid, perfluoroethylcyclohexane sulfonate, in the Great Lakes of North America. *Environ Sci Technol* 45:8060–8066. <https://doi.org/10.1021/es200135c>
- Deidda M, Piras C, Bassareo PP, et al (2015) Metabolomics, a promising approach to translational research in cardiology. *IJC Metabolic & Endocrine* 9:31–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijcme.2015.10.001>
- Dettmer K, Nürnberger N, Kaspar H, et al (2011) Metabolite extraction from adherently growing mammalian cells for metabolomics studies: Optimization of harvesting and extraction protocols. *Analytical and bioanalytical chemistry* 399:1127–39. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4425-x>
- Di Guida R, Engel J, Allwood JW, et al (2016) Non-targeted UHPLC-MS metabolomic data processing methods: a comparative investigation of normalisation, missing value imputation, transformation and scaling. *Metabolomics* 12:93. <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1030-9>
- Dietmair S, Timmins NE, Gray PP, et al (2010) Towards quantitative metabolomics of mammalian cells: Development of a metabolite extraction protocol. *Analytical Biochemistry* 404:155–164. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.04.031>
- Dodds J, Hopkins Z, Knappe D, Baker E (2020) Rapid Characterization of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) by Ion Mobility Spectrometry-Mass Spectrometry (IMS-MS). *Anal Chem* 92:4427–4435. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05364>
- Dona AC, Kyriakides M, Scott F, et al (2016) A guide to the identification of metabolites in NMR-based metabolomics/metabolomics experiments. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 14:135–153. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2016.02.005>
- Dubois C, Daumar P, Aubel C, et al (2019) The New Synthetic Serum-Free Medium OptiPASS Promotes High Proliferation and Drug Efficacy Prediction on Spheroids from MDA-MB-231 and SUM1315 Triple-Negative Breast Cancer Cell Lines. *J Clin Med* 8:. <https://doi.org/10.3390/jcm8030397>

- Dunn WB, Bailey NJC, Johnson HE (2005) Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst* 130:606–625. <https://doi.org/10.1039/B418288J>
- EFSA (2018) Toxicological Profile for Perfluoroalkyls, Draft for Public Comment. 852
- EFSA (2013) Scientific Opinion on the hazard assessment of endocrine disruptors: Scientific criteria for identification of endocrine disruptors and appropriateness of existing test methods for assessing effects mediated by these substances on human health and the environment. *EFSA Journal* 11:3132. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3132>
- EFSA (2008) Perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. *EFSA Journal* 6:653. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.653>
- Ejiri H, Nomura T, Hasegawa M, et al (2015) Use of synthetic serum-free medium for culture of human dermal fibroblasts to establish an experimental system similar to living dermis. *Cytotechnology* 67:507–514. <https://doi.org/10.1007/s10616-014-9709-0>
- Elcombe CR, Elcombe BM, Foster JR, et al (2010) Hepatocellular hypertrophy and cell proliferation in Sprague-Dawley rats following dietary exposure to ammonium perfluorooctanoate occurs through increased activation of the xenosensor nuclear receptors PPAR α and CAR/PXR. *Arch Toxicol* 84:787–798. <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0572-2>
- Emmett EA, Zhang H, Shofer FS, et al (2006) Community exposure to perfluorooctanoate: relationships between serum levels and certain health parameters. *J Occup Environ Med* 48:771–779. <https://doi.org/10.1097/01.jom.0000233380.13087.37>
- EPA O (2016) Drinking Water Health Advisories for PFOA and PFOS. In: US EPA. <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/drinking-water-health-advisories-pfoa-and-pfos>. Accessed 21 Sep 2020
- Eriksen KT, Raaschou-Nielsen O, McLaughlin JK, et al (2013) Association between plasma PFOA and PFOS levels and total cholesterol in a middle-aged Danish population. *PLoS ONE* 8:e56969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056969>
- Esteban (2019) Imprégnation de la population française par les composés perfluorés : Programme national de biosurveillance, Esteban 2014-2016. /import/impregnation-de-la-population-francaise-par-les-composes-perfluores-programme-national-de-biosurveillance-esteban-2014-2016. Accessed 5 Aug 2020
- EURION (2020) Improving Identification of Endocrine Disruptors | EURION. <https://eurion-cluster.eu/>. Accessed 19 Nov 2020
- EUR-Lex (2017) Commission Regulation (EU) 2017/1000 of 13 June 2017 amending Annex XVII to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards perfluorooctanoic acid (PFOA), its salts and PFOA-related substances (Text with EEA relevance.)

- Fang C-Y, Wu C-C, Fang C-L, et al (2017) Long-term growth comparison studies of FBS and FBS alternatives in six head and neck cell lines. *PLoS One* 12:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178960>
- Fernández-Albert F, Llorach R, Garcia-Aloy M, et al (2014) Intensity drift removal in LC/MS metabolomics by common variance compensation. *Bioinformatics* 30:2899–2905. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu423>
- Fiehn O (2001) Combining Genomics, Metabolome Analysis, and Biochemical Modelling to Understand Metabolic Networks. *Comp Funct Genomics* 2:155–168. <https://doi.org/10.1002/cfg.82>
- Fiehn O (2002) Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 48:155–171
- Fitz-Simon N, Fletcher T, Luster MI, et al (2013) Reductions in serum lipids with a 4-year decline in serum perfluorooctanoic acid and perfluorooctanesulfonic acid. *Epidemiology* 24:569–576. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e31829443ee>
- Florentin A, Deblonde T, Diguio N, et al (2011) Impacts of two perfluorinated compounds (PFOS and PFOA) on human hepatoma cells: cytotoxicity but no genotoxicity? *Int J Hyg Environ Health* 214:493–499. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.05.010>
- Forsthuber M, Kaiser AM, Granitzer S, et al (2020) Albumin is the major carrier protein for PFOS, PFOA, PFHxS, PFNA and PFDA in human plasma. *Environment International* 137:105324. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105324>
- Franco ME, Fernandez-Luna MT, Ramirez AJ, Lavado R (2020) Metabolomic-based assessment reveals dysregulation of lipid profiles in human liver cells exposed to environmental obesogens. *Toxicology and Applied Pharmacology* 398:115009. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115009>
- Frisbee, Brooks A. Paul, Maher Arthur, et al (2009) The C8 Health Project: Design, Methods, and Participants. *Environmental Health Perspectives* 117:1873–1882. <https://doi.org/10.1289/ehp.0800379>
- Fujii Y, Niisoe T, Harada KH, et al (2015) Toxicokinetics of perfluoroalkyl carboxylic acids with different carbon chain lengths in mice and humans. *Journal of Occupational Health* 57:1–12. <https://doi.org/10.1539/joh.14-0136-OA>
- Furdui VI, Stock NL, Ellis DA, et al (2007) Spatial Distribution of Perfluoroalkyl Contaminants in Lake Trout from the Great Lakes. *Environ Sci Technol* 41:1554–1559. <https://doi.org/10.1021/es0620484>
- Gaballah S, Swank A, Sobus JR, et al (2020) Evaluation of Developmental Toxicity, Developmental Neurotoxicity, and Tissue Dose in Zebrafish Exposed to GenX and Other PFAS. *Environ Health Perspect* 128:. <https://doi.org/10.1289/EHP5843>
- Gebbink WA, van Asseldonk L, van Leeuwen SPJ (2017) Presence of Emerging Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFASs) in River and Drinking Water near a

- Fluorochemical Production Plant in the Netherlands. *Environ Sci Technol* 51:11057–11065. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02488>
- Giacomoni F, Le Corguillé G, Monsoor M, et al (2015) Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics. *Bioinformatics* 31:1493–1495. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu813>
- Giesbertz P, Padberg I, Rein D, et al (2015) Metabolite profiling in plasma and tissues of ob/ob and db/db mice identifies novel markers of obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia* 58:2133–2143. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3656-y>
- Giesy JP, Naile JE, Khim JS, et al (2010) Aquatic Toxicology of Perfluorinated Chemicals. In: Whitacre DM (ed) *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer, New York, NY, pp 1–52
- Gil A, Siegel D, Permentier H, et al (2015) Stability of energy metabolites—An often overlooked issue in metabolomics studies: A review. *ELECTROPHORESIS* 36:2156–2169. <https://doi.org/10.1002/elps.201500031>
- Gleason JA, Post GB, Fagliano JA (2015) Associations of perfluorinated chemical serum concentrations and biomarkers of liver function and uric acid in the US population (NHANES), 2007-2010. *Environ Res* 136:8–14. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.10.004>
- Gobas F, Morrison H (2000) Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment. In: *Handbook of Property Estimation Methods for Chemicals: Environmental Health Sciences*. pp 189–231
- Godzien J, Ciborowski M, Whiley L, et al (2013) In-vial dual extraction liquid chromatography coupled to mass spectrometry applied to streptozotocin-treated diabetic rats. Tips and pitfalls of the method. *J Chromatogr A* 1304:52–60. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.029>
- Gonzalez B, François J, Renaud M (1997) A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. *Yeast* 13:1347–1355. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199711\)13:14<1347::AID-YEA176>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199711)13:14<1347::AID-YEA176>3.0.CO;2-O)
- Gowda GAN, Djukovic D (2014) Overview of Mass Spectrometry-Based Metabolomics: Opportunities and Challenges. *Methods Mol Biol* 1198:3–12. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1258-2_1
- Gripon P, Rumin S, Urban S, et al (2002) Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15655–15660. <https://doi.org/10.1073/pnas.232137699>
- Gstraunthaler G (2003) Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *ALTEX* 20:275–281

- Guignard D (2016) Impacts d'une exposition prénatale au bisphénol A sur la fonction thyroïdienne et le métabolome du système nerveux central fœtal. These de doctorat, Toulouse 3
- Gundert-Remy U, Barth H, Bürkle A, et al (2015) Toxicology: a discipline in need of academic anchoring—the point of view of the German Society of Toxicology. *Arch Toxicol* 89:1881–1893. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1577-7>
- Guruge KS, Yeung LWY, Yamanaka N, et al (2006) Gene expression profiles in rat liver treated with perfluorooctanoic acid (PFOA). *Toxicol Sci* 89:93–107. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj011>
- Han X, Kemper RA, Jepson GW (2005) Subcellular distribution and protein binding of perfluorooctanoic acid in rat liver and kidney. *Drug Chem Toxicol* 28:197–209. <https://doi.org/10.1081/dct-52547>
- Han X, Snow TA, Kemper RA, Jepson GW (2003) Binding of perfluorooctanoic acid to rat and human plasma proteins. *Chem Res Toxicol* 16:775–781. <https://doi.org/10.1021/tx034005w>
- Hao L, Wang J, Page D, et al (2018) Comparative Evaluation of MS-based Metabolomics Software and Its Application to Preclinical Alzheimer's Disease. *Scientific Reports* 8:9291. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27031-x>
- Harada K, Inoue K, Morikawa A, et al (2005) Renal clearance of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate in humans and their species-specific excretion. *Environ Res* 99:253–261. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2004.12.003>
- Harada KH, Koizumi A (2009) Environmental and biological monitoring of persistent fluorinated compounds in Japan and their toxicities. *Environ Health Prev Med* 14:7–19. <https://doi.org/10.1007/s12199-008-0058-5>
- Harano Y, Yasui K, Toyama T, et al (2006) Fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist, reduces hepatic steatosis and lipid peroxidation in fatty liver Shionogi mice with hereditary fatty liver. *Liver Int* 26:613–620. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2006.01265.x>
- Hart SN, Li Y, Nakamoto K, et al (2010) A comparison of whole genome gene expression profiles of HepaRG cells and HepG2 cells to primary human hepatocytes and human liver tissues. *Drug Metab Dispos* 38:988–994. <https://doi.org/10.1124/dmd.109.031831>
- Hartmann M, Zimmermann D, Nolte J (2008) Changes of the metabolism of the colon cancer cell line SW-480 under serum-free and serum-reduced growth conditions. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 44:458–463. <https://doi.org/10.1007/s11626-008-9133-x>
- Haughom B, Spydevold O (1992) The mechanism underlying the hypolipemic effect of perfluorooctanoic acid (PFOA), perfluorooctane sulphonic acid (PFOSA) and clofibrac acid. *Biochim Biophys Acta* 1128:65–72. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(92\)90258-w](https://doi.org/10.1016/0005-2760(92)90258-w)

- Hayton S, Maker GL, Mullaney I, Trengove RD (2017) Experimental design and reporting standards for metabolomics studies of mammalian cell lines. *Cell Mol Life Sci* 74:4421–4441. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2582-1>
- Heindel JJ, Blumberg B (2019) Environmental Obesogens: Mechanisms and Controversies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 59:89–106. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021304>
- Heng BC, Cowan CM, Basu S (2009) Comparison of Enzymatic and Non-Enzymatic Means of Dissociating Adherent Monolayers of Mesenchymal Stem Cells. *Biol Proced Online* 11:161–169. <https://doi.org/10.1007/s12575-009-9001-4>
- Herman S, Khoonsari P, aftab obaid, et al (2017) Mass spectrometry based metabolomics for in vitro systems pharmacology: pitfalls, challenges, and computational solutions. *Metabolomics* 13:. <https://doi.org/10.1007/s11306-017-1213-z>
- Hernández Bort JA, Shanmukam V, Pabst M, et al (2014) Reduced quenching and extraction time for mammalian cells using filtration and syringe extraction. *Journal of Biotechnology* 182–183:97–103. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.04.014>
- Heuillet M, Bellvert F, Cahoreau E, et al (2018) Methodology for the Validation of Isotopic Analyses by Mass Spectrometry in Stable-Isotope Labeling Experiments. *Anal Chem* 90:1852–1860. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03886>
- Heuillet M, Millard P, Cissé MY, et al (2020) Simultaneous Measurement of Metabolite Concentration and Isotope Incorporation by Mass Spectrometry. *Anal Chem* 92:5890–5896. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05709>
- Horning EC, Horning MG (1971) Human Metabolic Profiles Obtained by GC and GC/MS. *J Chromatogr Sci* 9:129–140. <https://doi.org/10.1093/chromsci/9.3.129>
- Houck MM, Siegel JA (2015) Chapter 6 - Separation Methods. In: Houck MM, Siegel JA (eds) *Fundamentals of Forensic Science (Third Edition)*. Academic Press, San Diego, pp 121–151
- Huang H-L, Hsing H-W, Lai T-C, et al (2010) Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *J Biomed Sci* 17:36. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-17-36>
- Humbert L, Hoizey G, Lhermitte M (2014) Chapter 7 - Drugs Involved in Drug-Facilitated Crimes (DFC): Analytical Aspects: 1—Blood and Urine. In: Kintz P (ed) *Toxicological Aspects of Drug-Facilitated Crimes*. Academic Press, Oxford, pp 159–180
- Hundley SG, Sarrif AM, Kennedy GL (2006) Absorption, distribution, and excretion of ammonium perfluorooctanoate (APFO) after oral administration to various species. *Drug Chem Toxicol* 29:137–145. <https://doi.org/10.1080/01480540600561361>
- Hutschenreuther A, Kiontke A, Birkenmeier G, Birkemeyer C (2012) Comparison of extraction conditions and normalization approaches for cellular metabolomics of adherent growing cells with GC-MS. *Anal Methods* 4:1953–1963. <https://doi.org/10.1039/C2AY25046B>

- Idle JR, Gonzalez FJ (2007) *Metabolomics. Cell Metab* 6:348–351. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.005>
- Jin R, McConnell R, Catherine C, et al (2020) Perfluoroalkyl substances and severity of nonalcoholic fatty liver in Children: An untargeted metabolomics approach. *Environment International* 134:105220. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105220>
- Jurowski K, Kochan K, Walczak J, et al (2017) Analytical Techniques in Lipidomics: State of the Art. *Crit Rev Anal Chem* 47:418–437. <https://doi.org/10.1080/10408347.2017.1310613>
- Kandárová H, Letašiová S (2011) Alternative methods in toxicology: pre-validated and validated methods. *Interdiscip Toxicol* 4:107–113. <https://doi.org/10.2478/v10102-011-0018-6>
- Kannan K, Tao L, Sinclair E, et al (2005) Perfluorinated compounds in aquatic organisms at various trophic levels in a Great Lakes food chain. *Arch Environ Contam Toxicol* 48:559–566. <https://doi.org/10.1007/s00244-004-0133-x>
- Kao Y-T, Gonzalez KL, Bartel B (2018) Peroxisome Function, Biogenesis, and Dynamics in Plants1[OPEN]. *Plant Physiol* 176:162–177. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01050>
- Kato K, Wong L-Y, Chen A, et al (2014) Changes in serum concentrations of maternal poly- and perfluoroalkyl substances over the course of pregnancy and predictors of exposure in a multiethnic cohort of Cincinnati, Ohio pregnant women during 2003–2006. *Environ Sci Technol* 48:9600–9608. <https://doi.org/10.1021/es501811k>
- Kawashima Y, Kobayashi H, Miura H, Kozuka H (1995) Characterization of hepatic responses of rat to administration of perfluorooctanoic and perfluorodecanoic acids at low levels. *Toxicology* 99:169–178. [https://doi.org/10.1016/0300-483x\(95\)03027-d](https://doi.org/10.1016/0300-483x(95)03027-d)
- Kelly BC, Ikonomou MG, Blair JD, et al (2009) Perfluoroalkyl Contaminants in an Arctic Marine Food Web: Trophic Magnification and Wildlife Exposure. *Environ Sci Technol* 43:4037–4043. <https://doi.org/10.1021/es9003894>
- Kemper R, Jepson G (2003) Pharmacokinetics of perfluorooctanoic acid in male and female rats. OXFORD UNIV PRESS GREAT CLARENDON ST, OXFORD OX2 6DP, ENGLAND, pp 148–148
- Kemper RA, Nabb DL (2005) In vitro studies in microsomes from rat and human liver, kidney, and intestine suggest that perfluorooctanoic acid is not a substrate for microsomal UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Chem Toxicol* 28:281–287. <https://doi.org/10.1081/dct-200064468>
- Kennedy GL, Butenhoff JL, Olsen GW, et al (2004) The Toxicology of Perfluorooctanoate. *Critical Reviews in Toxicology* 34:351–384. <https://doi.org/10.1080/10408440490464705>
- Kersten S (2014) Integrated physiology and systems biology of PPAR α . *Mol Metab* 3:354–371. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.02.002>

- Kim S-J, Heo S-H, Lee D-S, et al (2016) Gender differences in pharmacokinetics and tissue distribution of 3 perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in rats. *Food and Chemical Toxicology* 97:243–255. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.09.017>
- Krafft M, Riess J (2015) Per- and polyfluorinated substances (PFASs): Environmental challenges. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 20:. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2015.07.004>
- Kubwabo C, Stewart B, Zhu J, Marro L (2005) Occurrence of perfluorosulfonates and other perfluorochemicals in dust from selected homes in the city of Ottawa, Canada. *J Environ Monit* 7:1074–1078. <https://doi.org/10.1039/b507731c>
- Kudo N, Katakura M, Sato Y, Kawashima Y (2002) Sex hormone-regulated renal transport of perfluorooctanoic acid. *Chem Biol Interact* 139:301–316. [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(02\)00006-6](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(02)00006-6)
- Kudo N, Mizuguchi H, Yamamoto A, Kawashima Y (1999) Alterations by perfluorooctanoic acid of glycerolipid metabolism in rat liver. *Chemico-Biological Interactions* 118:69–83. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(99\)00002-2](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(99)00002-2)
- Lapins M, Eklund M, Spjuth O, et al (2008) Proteochemometric modeling of HIV protease susceptibility. *BMC Bioinformatics* 9:181. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-181>
- Lath S, Knight ER, Navarro DA, et al (2019) Sorption of PFOA onto different laboratory materials: Filter membranes and centrifuge tubes. *Chemosphere* 222:671–678. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.096>
- Lau C (2012) Perfluoroalkyl acids: Recent research highlights. *Reproductive Toxicology* 33:405–409. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.03.002>
- Lau C, Anitole K, Hodes C, et al (2007) Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings. *Toxicol Sci* 99:366–394. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm128>
- Le Vee M, Noel G, Jouan E, et al (2013) Polarized expression of drug transporters in differentiated human hepatoma HepaRG cells. *Toxicol In Vitro* 27:1979–1986. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.07.003>
- Lebkuchen A, Carvalho VM, Venturini G, et al (2018) Metabolomic and lipidomic profile in men with obstructive sleep apnoea: implications for diagnosis and biomarkers of cardiovascular risk. *Scientific Reports* 8:11270. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29727-6>
- Lee YJ, Kim M-K, Bae J, Yang J-H (2013) Concentrations of perfluoroalkyl compounds in maternal and umbilical cord sera and birth outcomes in Korea. *Chemosphere* 90:1603–1609. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.08.035>
- Legler J, Zalko D, Jourdan F, et al (2020) The GOLIATH Project: Towards an Internationally Harmonised Approach for Testing Metabolism Disrupting Compounds. *International Journal of Molecular Sciences* 21:3480. <https://doi.org/10.3390/ijms21103480>

- León Z, García-Cañaveras JC, Donato MT, Lahoz A (2013) Mammalian cell metabolomics: Experimental design and sample preparation. *ELECTROPHORESIS* 34:2762–2775. <https://doi.org/10.1002/elps.201200605>
- Li B, Tang J, Yang Q, et al (2016) Performance Evaluation and Online Realization of Data-driven Normalization Methods Used in LC/MS based Untargeted Metabolomics Analysis. *Scientific Reports* 6:38881. <https://doi.org/10.1038/srep38881>
- Li Y, Xu Y, Scott K, et al (2019) Half-lives of PFOA, PFPeS, PFHxS, PFHpS and PFOS after end of exposure to contaminated drinking water. *Environmental Epidemiology* 3:237. <https://doi.org/10.1097/01.EE9.0000608476.06577.16>
- Li Y, Zhang Z, Liu X, et al (2015) A novel approach to the simultaneous extraction and non-targeted analysis of the small molecules metabolome and lipidome using 96-well solid phase extraction plates with column-switching technology. *J Chromatogr A* 1409:277–281. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.048>
- Lin C-Y, Lin L-Y, Chiang C-K, et al (2010) Investigation of the associations between low-dose serum perfluorinated chemicals and liver enzymes in US adults. *Am J Gastroenterol* 105:1354–1363. <https://doi.org/10.1038/ajg.2009.707>
- Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK (2006) Metabonomics Techniques and Applications to Pharmaceutical Research & Development. *Pharm Res* 23:1075–1088. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-0025-z>
- Loccisano AE, Campbell JL, Butenhoff JL, et al (2012) Comparison and evaluation of pharmacokinetics of PFOA and PFOS in the adult rat using a physiologically based pharmacokinetic model. *Reprod Toxicol* 33:452–467. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.04.006>
- Longo N, Frigeni M, Pasquali M (2016) CARNITINE TRANSPORT AND FATTY ACID OXIDATION. *Biochim Biophys Acta* 1863:2422–2435. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.01.023>
- Loos R, Locoro G, Huber T, et al (2008) Analysis of perfluorooctanoate (PFOA) and other perfluorinated compounds (PFCs) in the River Po watershed in N-Italy. *Chemosphere* 71:306–313. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.09.022>
- Louisse J, Rijkers D, Stoopen G, et al (2020) Perfluorooctanoic acid (PFOA), perfluorooctane sulfonic acid (PFOS), and perfluorononanoic acid (PFNA) increase triglyceride levels and decrease cholesterogenic gene expression in human HepaRG liver cells. *Archives of Toxicology* 94:3137–3155. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02808-0>
- Lu Y, Boekschoten MV, Wopereis S, et al (2011) Comparative transcriptomic and metabolomic analysis of fenofibrate and fish oil treatments in mice. *Physiol Genomics* 43:1307–1318. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00100.2011>
- Lynch T, Price AL (2007) The Effect of Cytochrome P450 Metabolism on Drug Response, Interactions, and Adverse Effects. *AFP* 76:391–396

- Lynn K-S, Cheng M-L, Chen Y-R, et al (2015) Metabolite identification for mass spectrometry-based metabolomics using multiple types of correlated ion information. *Anal Chem* 87:2143–2151. <https://doi.org/10.1021/ac503325c>
- Ma S, Liu S, Wang Q, et al (2020) Fenofibrate-induced hepatotoxicity: A case with a special feature that is different from those in the LiverTox database. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 45:204–207. <https://doi.org/10.1111/jcpt.13042>
- Maertens A, Bouhifd M, Zhao L, et al (2017) Metabolomic network analysis of estrogen-stimulated MCF-7 cells: a comparison of overrepresentation analysis, quantitative enrichment analysis and pathway analysis versus metabolite network analysis. *Arch Toxicol* 91:217–230. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1695-x>
- Maestri L, Negri S, Ferrari M, et al (2006) Determination of perfluorooctanoic acid and perfluorooctanesulfonate in human tissues by liquid chromatography/single quadrupole mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20:2728–2734. <https://doi.org/10.1002/rcm.2661>
- Mann M, Kelleher NL (2008) Precision proteomics: The case for high resolution and high mass accuracy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:18132–18138. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800788105>
- Marshall DD, Powers R (2017) Beyond the paradigm: Combining mass spectrometry and nuclear magnetic resonance for metabolomics. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 100:1–16. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2017.01.001>
- Martano G, Delmotte N, Kiefer P, et al (2015) Fast sampling method for mammalian cell metabolic analyses using liquid chromatography-mass spectrometry. *Nat Protoc* 10:1–11. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.198>
- Martin JW, Whittle DM, Muir DCG, Mabury SA (2004) Perfluoroalkyl Contaminants in a Food Web from Lake Ontario. *Environ Sci Technol* 38:5379–5385. <https://doi.org/10.1021/es049331s>
- Mastovska K (2013) Modern Analysis of Chemical Contaminants in Food. In: *Food Safety Magazine*. <https://www.foodsafetymagazine.com/magazine-archive1/februarymarch-2013/modern-analysis-of-chemical-contaminants-in-food/>. Accessed 25 Aug 2020
- McCombie G, Browning LM, Titman CM, et al (2009) ω -3 oil intake during weight loss in obese women results in remodelling of plasma triglyceride and fatty acids. *Metabolomics* 5:363–374. <https://doi.org/10.1007/s11306-009-0161-7>
- McGill MR (2016) The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers. *EXCLI J* 15:817–828. <https://doi.org/10.17179/excli2016-800>
- Merrick BA, Paules RS, Tice RR (2015) Intersection of toxicogenomics and high throughput screening in the Tox21 program: an NIEHS perspective. *Int J Biotechnol* 14:7–27. <https://doi.org/10.1504/IJBT.2015.074797>

- Misra BB (2020) Data normalization strategies in metabolomics: Current challenges, approaches, and tools: *European Journal of Mass Spectrometry*. <https://doi.org/10.1177/1469066720918446>
- Mitchell J (2020) PFAS Contamination from US Military Facilities in Mainland Japan and Okinawa. *The Asia-Pacific Journal: Japan Focus* 18:1–21
- Monneret C (2017) What is an endocrine disruptor? *C R Biol* 340:403–405. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2017.07.004>
- Munoz G (2015) Ecodynamique des composés poly- et perfluoroalkylés dans les écosystèmes aquatiques. Phdthesis, Université de Bordeaux
- Muschet C, Möller G, Prehn C, et al (2016) Removing the bottlenecks of cell culture metabolomics: fast normalization procedure, correlation of metabolites to cell number, and impact of the cell harvesting method. *Metabolomics* 12:. <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1104-8>
- Nakayasu ES, Nicora CD, Sims AC, et al (2016) MPLEx: a Robust and Universal Protocol for Single-Sample Integrative Proteomic, Metabolomic, and Lipidomic Analyses. *mSystems* 1:. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00043-16>
- Nelson JW, Hatch EE, Webster TF (2010) Exposure to polyfluoroalkyl chemicals and cholesterol, body weight, and insulin resistance in the general U.S. population. *Environ Health Perspect* 118:197–202. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901165>
- Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E (1999) “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 29:1181–1189. <https://doi.org/10.1080/004982599238047>
- Nicholson JK, O’Flynn MP, Sadler PJ, et al (1984) Proton-nuclear-magnetic-resonance studies of serum, plasma and urine from fasting normal and diabetic subjects. *Biochem J* 217:365–375. <https://doi.org/10.1042/bj2170365>
- Nissen JD, Pajęcka K, Stridh MH, et al (2015) Dysfunctional TCA-Cycle Metabolism in Glutamate Dehydrogenase Deficient Astrocytes. *Glia* 63:2313–2326. <https://doi.org/10.1002/glia.22895>
- OCDE (2018) Synthesis paper on per and polyfluorinated chemicals - OECD. <https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-management/synthesis-paper-on-per-and-polyfluorinated-chemicals.htm>. Accessed 25 Aug 2020
- Ode A, Rylander L, Lindh CH, et al (2013) Determinants of maternal and fetal exposure and temporal trends of perfluorinated compounds. *Environ Sci Pollut Res* 20:7970–7978. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1573-5>
- O’Driscoll L, Gammell P, McKiernan E, et al (2006) Phenotypic and global gene expression profile changes between low passage and high passage MIN-6 cells. *J Endocrinol* 191:665–676. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06894>

- Ohta T, Masutomi N, Tsutsui N, et al (2009) Untargeted metabolomic profiling as an evaluative tool of fenofibrate-induced toxicology in Fischer 344 male rats. *Toxicol Pathol* 37:521–535. <https://doi.org/10.1177/0192623309336152>
- Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F (1998) Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology* 16:373–378. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01214-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01214-1)
- Olsen GW, Burris JM, Ehresman DJ, et al (2007) Half-life of serum elimination of perfluorooctanesulfonate, perfluorohexanesulfonate, and perfluorooctanoate in retired fluorochemical production workers. *Environ Health Perspect* 115:1298–1305. <https://doi.org/10.1289/ehp.10009>
- Olsen GW, Mair DC, Lange CC, et al (2017) Per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in American Red Cross adult blood donors, 2000–2015. *Environmental Research* 157:87–95. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.05.013>
- Olsen GW, Zobel LR (2007) Assessment of lipid, hepatic, and thyroid parameters with serum perfluorooctanoate (PFOA) concentrations in fluorochemical production workers. *Int Arch Occup Environ Health* 81:231–246. <https://doi.org/10.1007/s00420-007-0213-0>
- Oosterveer MH, Grefhorst A, van Dijk TH, et al (2009) Fenofibrate simultaneously induces hepatic fatty acid oxidation, synthesis, and elongation in mice. *J Biol Chem* 284:34036–34044. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.051052>
- Orata F, Quinete N, Werres F, Wilken R-D (2009) Determination of Perfluorooctanoic Acid and Perfluorooctane Sulfonate in Lake Victoria Gulf Water. *Bull Environ Contam Toxicol* 82:218–222. <https://doi.org/10.1007/s00128-008-9543-1>
- Pastoor TP, Lee KP, Perri MA, Gillies PJ (1987) Biochemical and morphological studies of ammonium perfluorooctanoate-induced hepatomegaly and peroxisome proliferation. *Experimental and Molecular Pathology* 47:98–109. [https://doi.org/10.1016/0014-4800\(87\)90011-6](https://doi.org/10.1016/0014-4800(87)90011-6)
- Peng S, Yan L, Zhang J, et al (2013) An integrated metabolomics and transcriptomics approach to understanding metabolic pathway disturbance induced by perfluorooctanoic acid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 86:56–64. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.07.014>
- Pérez F, Nadal M, Navarro-Ortega A, et al (2013) Accumulation of perfluoroalkyl substances in human tissues. *Environment International* 59:354–362. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.004>
- Perkins RG, Butenhoff JL, Kennedy GL, Palazzolo MJ (2004) 13-week dietary toxicity study of ammonium perfluorooctanoate (APFO) in male rats. *Drug Chem Toxicol* 27:361–378. <https://doi.org/10.1081/dct-200039773>
- Pierozan P, Jerneer F, Karlsson O (2018) Perfluorooctanoic acid (PFOA) exposure promotes proliferation, migration and invasion potential in human breast epithelial cells. *Arch Toxicol* 92:1729–1739. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2181-4>

- Pinu FR, Villas-Boas SG, Aggio R (2017) Analysis of Intracellular Metabolites from Microorganisms: Quenching and Extraction Protocols. *Metabolites* 7:. <https://doi.org/10.3390/metabo7040053>
- Pitt JJ (2009) Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *Clin Biochem Rev* 30:19–34
- Pizzurro DM, Seeley M, Kerper LE, Beck BD (2019) Interspecies differences in perfluoroalkyl substances (PFAS) toxicokinetics and application to health-based criteria. *Regul Toxicol Pharmacol* 106:239–250. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.05.008>
- Poole CF, Poole SK (2010) Extraction of organic compounds with room temperature ionic liquids. *Journal of Chromatography A* 1217:2268–2286. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.011>
- Prevedouros K, Cousins IT, Buck RC, Korzeniowski SH (2006) Sources, Fate and Transport of Perfluorocarboxylates. *Environ Sci Technol* 40:32–44. <https://doi.org/10.1021/es0512475>
- Qiu Z, Qu K, Luan F, et al (2020) Binding specificities of estrogen receptor with perfluorinated compounds: A cross species comparison. *Environment International* 134:105284. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105284>
- Rabinowitz JD, Kimball E (2007) Acidic acetonitrile for cellular metabolome extraction from *Escherichia coli*. *Anal Chem* 79:6167–6173. <https://doi.org/10.1021/ac070470c>
- Ramirez T, Daneshian M, Kamp H, et al (2013) Metabolomics in Toxicology and Preclinical Research. *ALTEX* 30:209–225
- Rampler E, Egger D, Schoeny H, et al (2019) The Power of LC-MS Based Multiomics: Exploring Adipogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells. *Molecules* 24:. <https://doi.org/10.3390/molecules24193615>
- Rebholz SL, Jones T, Herrick RL, et al (2016) Hypercholesterolemia with consumption of PFOA-laced Western diets is dependent on strain and sex of mice. *Toxicol Rep* 3:46–54. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.11.004>
- Ribbenstedt A, Ziarrusta H, Benskin JP (2018) Development, characterization and comparisons of targeted and non-targeted metabolomics methods. *PLoS One* 13:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207082>
- Roberts LD, Souza AL, Gerszten RE, Clish CB (2012) Targeted Metabolomics. *Curr Protoc Mol Biol* CHAPTER:Unit30.2. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3002s98>
- Rodriguez CE, Setzer RW, Barton HA (2009) Pharmacokinetic modeling of perfluorooctanoic acid during gestation and lactation in the mouse. *Reprod Toxicol* 27:373–386. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.02.009>
- Rogue A, Anthérieu S, Vluggens A, et al (2014) PPAR agonists reduce steatosis in oleic acid-overloaded HepaRG cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 276:73–81. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.02.001>

- Rombouts C, De Spiegeleer M, Van Meulebroek L, et al (2019) Validated comprehensive metabolomics and lipidomics analysis of colon tissue and cell lines. *Analytica Chimica Acta* 1066:79–92. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.03.020>
- Rosen MB, Abbott BD, Wolf DC, et al (2008) Gene profiling in the livers of wild-type and PPAR α -null mice exposed to perfluorooctanoic acid. *Toxicol Pathol* 36:592–607. <https://doi.org/10.1177/0192623308318208>
- Rosen MB, Das KP, Rooney J, et al (2017) PPAR α -independent transcriptional targets of perfluoroalkyl acids revealed by transcript profiling. *Toxicology* 387:95–107. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.05.013>
- Sakr CJ, Kreckmann KH, Green JW, et al (2007) Cross-sectional study of lipids and liver enzymes related to a serum biomarker of exposure (ammonium perfluorooctanoate or APFO) as part of a general health survey in a cohort of occupationally exposed workers. *J Occup Environ Med* 49:1086–1096. <https://doi.org/10.1097/JOM.0b013e318156eca3>
- Salihovic S, Fall T, Ganna A, et al (2019) Identification of metabolic profiles associated with human exposure to perfluoroalkyl substances. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology* 29:196–205. <https://doi.org/10.1038/s41370-018-0060-y>
- Schechter A, Colacino J, Haffner D, et al (2010) Perfluorinated compounds, polychlorinated biphenyls, and organochlorine pesticide contamination in composite food samples from Dallas, Texas, USA. *Environ Health Perspect* 118:796–802. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901347>
- Schrenk D, Bignami M, Bodin L, et al (2020) Risk to human health related to the presence of perfluoroalkyl substances in food. *EFSA Journal* 18:e06223. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6223>
- Schrimpe-Rutledge AC, Codreanu SG, Sherrod SD, McLean JA (2016) Untargeted metabolomics strategies – Challenges and Emerging Directions. *J Am Soc Mass Spectrom* 27:1897–1905. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1469-y>
- Schroeder MA, Atherton HJ, Dodd MS, et al (2012) The Cycling of Acetyl-CoA through Acetylcarnitine Buffers Cardiac Substrate Supply: A Hyperpolarised ^{13}C Magnetic Resonance Study. *Circ Cardiovasc Imaging* 5:201–209. <https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.111.969451>
- Sellick CA, Knight D, Croxford AS, et al (2010) Evaluation of extraction processes for intracellular metabolite profiling of mammalian cells: matching extraction approaches to cell type and metabolite targets. *Metabolomics* 6:427–438. <https://doi.org/10.1007/s11306-010-0216-9>
- Serkova NJ, Standiford TJ, Stringer KA (2011) The Emerging Field of Quantitative Blood Metabolomics for Biomarker Discovery in Critical Illnesses. *Am J Respir Crit Care Med* 184:647–655. <https://doi.org/10.1164/rccm.201103-0474CI>
- Shin H-M, Vieira VM, Ryan PB, et al (2011a) Retrospective Exposure Estimation and Predicted versus Observed Serum Perfluorooctanoic Acid Concentrations for Participants in the

- Shin H-M, Vieira VM, Ryan PB, et al (2011b) Environmental fate and transport modeling for perfluorooctanoic acid emitted from the Washington Works Facility in West Virginia. *Environ Sci Technol* 45:1435–1442. <https://doi.org/10.1021/es102769t>
- Shryock JC, Rubio R, Berne RM (1986) Extraction of adenine nucleotides from cultured endothelial cells. *Analytical Biochemistry* 159:73–81. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90309-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90309-X)
- Silva LP, Lorenzi PL, Purwaha P, et al (2013) Measurement of DNA concentration as a normalization strategy for metabolomic data from adherent cell lines. *Anal Chem* 85:. <https://doi.org/10.1021/ac401559v>
- Sinclair E, Kim SK, Akinleye HB, Kannan K (2007) Quantitation of gas-phase perfluoroalkyl surfactants and fluorotelomer alcohols released from nonstick cookware and microwave popcorn bags. *Environ Sci Technol* 41:1180–1185. <https://doi.org/10.1021/es062377w>
- Sinclair E, Mayack DT, Roblee K, et al (2006) Occurrence of perfluoroalkyl surfactants in water, fish, and birds from New York State. *Arch Environ Contam Toxicol* 50:398–410. <https://doi.org/10.1007/s00244-005-1188-z>
- Smith L, Villaret-Cazadamont J, Claus SP, et al (2020) Important Considerations for Sample Collection in Metabolomics Studies with a Special Focus on Applications to Liver Functions. *Metabolites* 10:. <https://doi.org/10.3390/metabo10030104>
- Soldatow VY, LeCluyse EL, Griffith LG, Rusyn I (2013) In vitro models for liver toxicity testing. *Toxicol Res (Camb)* 2:23–39. <https://doi.org/10.1039/C2TX20051A>
- Sonnaert M, Papantoniou I, Luyten FP, Schrooten J (2015) Quantitative Validation of the Presto Blue™ Metabolic Assay for Online Monitoring of Cell Proliferation in a 3D Perfusion Bioreactor System. *Tissue Eng Part C Methods* 21:519–529. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2014.0255>
- Soria A, Bocos C, Herrera E (2002) Opposite metabolic response to fenofibrate treatment in pregnant and virgin rats. *J Lipid Res* 43:74–81
- Steenland K, Tinker S, Frisbee S, et al (2009) Association of perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate with serum lipids among adults living near a chemical plant. *Am J Epidemiol* 170:1268–1278. <https://doi.org/10.1093/aje/kwp279>
- Street ME, Bernasconi S (2020) Endocrine-Disrupting Chemicals in Human Fetal Growth. *Int J Mol Sci* 21:. <https://doi.org/10.3390/ijms21041430>
- Sun Z, Zhang C, Yan H, et al (2017) Spatiotemporal distribution and potential sources of perfluoroalkyl acids in Huangpu River, Shanghai, China. *Chemosphere* 174:127–135. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.122>
- Sunderland EM, Hu XC, Dassuncao C, et al (2019) A Review of the Pathways of Human Exposure to Poly- and Perfluoroalkyl Substances (PFASs) and Present Understanding

- of Health Effects. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 29:131–147. <https://doi.org/10.1038/s41370-018-0094-1>
- Swainston N, Smallbone K, Hefzi H, et al (2016) Recon 2.2: from reconstruction to model of human metabolism. *Metabolomics* 12:. <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1051-4>
- Takacs ML, Abbott BD (2007) Activation of mouse and human peroxisome proliferator-activated receptors (alpha, beta/delta, gamma) by perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate. *Toxicol Sci* 95:108–117. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl135>
- Tan SZ, Begley P, Mullard G, et al (2016) Introduction to metabolomics and its applications in ophthalmology. *Eye (Lond)* 30:773–783. <https://doi.org/10.1038/eye.2016.37>
- Tan X, Xie G, Sun X, et al (2013) High fat diet feeding exaggerates perfluorooctanoic acid-induced liver injury in mice via modulating multiple metabolic pathways. *PLoS ONE* 8:e61409. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061409>
- Taylor WR (2006) Transcription and translation in an RNA world. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 361:1751–1760. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1910>
- Teng Q, Huang W, Collette TW, et al (2008) A direct cell quenching method for cell-culture based metabolomics. *Metabolomics* 5:199. <https://doi.org/10.1007/s11306-008-0137-z>
- Thiele I, Palsson BØ (2010) A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nature Protocols* 5:93–121. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.203>
- Thompson J, Eaglesham G, Reungoat J, et al (2011) Removal of PFOS, PFOA and other perfluoroalkyl acids at water reclamation plants in South East Queensland Australia. *Chemosphere* 82:9–17. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.040>
- Thompson LA, Darwish WS (2019) Environmental Chemical Contaminants in Food: Review of a Global Problem. *J Toxicol* 2019:. <https://doi.org/10.1155/2019/2345283>
- Timmermann CAG, Rossing LI, Grøntved A, et al (2014) Adiposity and glycemic control in children exposed to perfluorinated compounds. *J Clin Endocrinol Metab* 99:E608–614. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-3460>
- Tittlemier SA, Pepper K, Seymour C, et al (2007) Dietary exposure of Canadians to perfluorinated carboxylates and perfluorooctane sulfonate via consumption of meat, fish, fast foods, and food items prepared in their packaging. *J Agric Food Chem* 55:3203–3210. <https://doi.org/10.1021/jf0634045>
- Trudel D, Horowitz L, Wormuth M, et al (2008) Estimating consumer exposure to PFOS and PFOA. *Risk Anal* 28:251–269. <https://doi.org/10.1111/j.1539-6924.2008.01017.x>
- Tsoko M, Beauseigneur F, Gresti J, et al (1998) Hypolipidaemic effects of fenofibrate are not altered by mildronate-mediated normalization of carnitine concentration in rat liver. *Biochimie* 80:943–948. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(00\)88891-4](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(00)88891-4)

- Tsuji K, Ojima M, Otabe K, et al (2017) Effects of Different Cell-Detaching Methods on the Viability and Cell Surface Antigen Expression of Synovial Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplant* 26:1089–1102. <https://doi.org/10.3727/096368917X694831>
- Turi KN, Romick-Rosendale L, Ryckman KK, Hartert TV (2018) A review of metabolomics approaches and their application in identifying causal pathways of childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 141:1191–1201. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.04.021>
- Vanden Heuvel JP, Kuslikis BI, Van Rafelghem MJ, Peterson RE (1991) Tissue distribution, metabolism, and elimination of perfluorooctanoic acid in male and female rats. *Journal of Biochemical Toxicology* 6:83–92. <https://doi.org/10.1002/jbt.2570060202>
- Vanden Heuvel JP, Thompson JT, Frame SR, Gillies PJ (2006) Differential activation of nuclear receptors by perfluorinated fatty acid analogs and natural fatty acids: a comparison of human, mouse, and rat peroxisome proliferator-activated receptor- α , - β , and - γ , liver X receptor- β , and retinoid X receptor- α . *Toxicol Sci* 92:476–489. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl014>
- Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, et al (2012) Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocr Rev* 33:378–455. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1050>
- Vierke L, Staude C, Biegel-Engler A, et al (2012) Perfluorooctanoic acid (PFOA) — main concerns and regulatory developments in Europe from an environmental point of view. *Environmental Sciences Europe* 24:16. <https://doi.org/10.1186/2190-4715-24-16>
- Vijay Kapoore R, Coyle R, A. Staton C, et al (2017) Influence of washing and quenching in profiling the metabolome of adherent mammalian cells: a case study with the metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231. *Analyst* 142:2038–2049. <https://doi.org/10.1039/C7AN00207F>
- Villaret-Cazadamont J, Poupin N, Tournadre A, et al (2020) An Optimized Dual Extraction Method for the Simultaneous and Accurate Analysis of Polar Metabolites and Lipids Carried out on Single Biological Samples. *Metabolites* 10:. <https://doi.org/10.3390/metabo10090338>
- Villas-Bôas SG, Højer-Pedersen J, Akesson M, et al (2005) Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods. *Yeast* 22:1155–1169. <https://doi.org/10.1002/yea.1308>
- Vuckovic D (2018) Improving metabolome coverage and data quality: advancing metabolomics and lipidomics for biomarker discovery. *Chem Commun (Camb)* 54:6728–6749. <https://doi.org/10.1039/c8cc02592d>
- Wadia PR, Cabaton NJ, Borrero MD, et al (2013) Low-Dose BPA Exposure Alters the Mesenchymal and Epithelial Transcriptomes of the Mouse Fetal Mammary Gland. *PLoS One* 8:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063902>
- Wang L, Wang Y, Liang Y, et al (2013) Specific Accumulation of Lipid Droplets in Hepatocyte Nuclei of PFOA-exposed BALB/c Mice. *Sci Rep* 3:. <https://doi.org/10.1038/srep02174>

- Wawrzyniak R, Kosnowska A, Macioszek S, et al (2018) New plasma preparation approach to enrich metabolome coverage in untargeted metabolomics: plasma protein bound hydrophobic metabolite release with proteinase K. *Sci Rep* 8:9541. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27983-0>
- Weibel KE, Mor J-R, Fiechter A (1974) Rapid sampling of yeast cells and automated assays of adenylate, citrate, pyruvate and glucose-6-phosphate pools. *Analytical Biochemistry* 58:208–216. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(74\)90459-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(74)90459-X)
- Wenger SL, Senft JR, Sargent LM, et al (2004) Comparison of Established Cell Lines at Different Passages by Karyotype and Comparative Genomic Hybridization. *Biosci Rep* 24:631–639. <https://doi.org/10.1007/s10540-005-2797-5>
- Whiley L, Godzien J, Ruperez FJ, et al (2012) In-vial dual extraction for direct LC-MS analysis of plasma for comprehensive and highly reproducible metabolic fingerprinting. *Anal Chem* 84:5992–5999. <https://doi.org/10.1021/ac300716u>
- White SS, Stanko JP, Kato K, et al (2011) Gestational and chronic low-dose PFOA exposures and mammary gland growth and differentiation in three generations of CD-1 mice. *Environ Health Perspect* 119:1070–1076. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002741>
- Williams roger (1951) Individual metabolic patterns and human disease : an exploratory study utilizing predominantly paper chromatographic methods
- Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, et al (2018) HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res* 46:D608–D617. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1089>
- World Health Organization (ed) (2015) WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. World Health Organization, Geneva, Switzerland
- Worley RR, Yang X, Fisher J (2017) Physiologically based pharmacokinetic modeling of human exposure to perfluorooctanoic acid suggests historical non drinking-water exposures are important for predicting current serum concentrations. *Toxicol Appl Pharmacol* 330:9–21. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.07.001>
- Woskie SR, Gore R, Steenland K (2012) Retrospective exposure assessment of perfluorooctanoic acid serum concentrations at a fluoropolymer manufacturing plant. *Ann Occup Hyg* 56:1025–1037. <https://doi.org/10.1093/annhyg/mes023>
- Wu L, Mashego MR, van Dam JC, et al (2005) Quantitative analysis of the microbial metabolome by isotope dilution mass spectrometry using uniformly ¹³C-labeled cell extracts as internal standards. *Analytical Biochemistry* 336:164–171. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.09.001>
- Xie Y, Yang Q, Nelson BD, DePierre JW (2003) The relationship between liver peroxisome proliferation and adipose tissue atrophy induced by peroxisome proliferator exposure and withdrawal in mice. *Biochem Pharmacol* 66:749–756. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(03\)00386-1](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(03)00386-1)

- Xu X-B, He Y, Song C, et al (2014) Bisphenol A regulates the estrogen receptor alpha signaling in developing hippocampus of male rats through estrogen receptor. *Hippocampus* 24:1570–1580. <https://doi.org/10.1002/hipo.22336>
- Yamaguchi M, Arisawa K, Uemura H, et al (2013) Consumption of seafood, serum liver enzymes, and blood levels of PFOS and PFOA in the Japanese population. *J Occup Health* 55:184–194. <https://doi.org/10.1539/joh.12-0264-oa>
- Yamashita N, Kannan K, Taniyasu S, et al (2005) A global survey of perfluorinated acids in oceans. *Mar Pollut Bull* 51:658–668. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.04.026>
- Yan F, Wang Q, Xu C, et al (2014) Peroxisome proliferator-activated receptor α activation induces hepatic steatosis, suggesting an adverse effect. *PLoS ONE* 9:e99245. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099245>
- Yang Q, Nagano T, Shah Y, et al (2008) The PPAR alpha-humanized mouse: a model to investigate species differences in liver toxicity mediated by PPAR alpha. *Toxicol Sci* 101:132–139. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm206>
- Yang Z, Song Z, Chen Z, et al (2020) Metabolic and lipidomic characterization of malignant pleural effusion in human lung cancer. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 180:113069. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.113069>
- Ye X, Strynar MJ, Nakayama SF, et al (2008) Perfluorinated compounds in whole fish homogenates from the Ohio, Missouri, and Upper Mississippi Rivers, USA. *Environ Pollut* 156:1227–1232. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.03.014>
- Yu H, Cook TJ, Sinko PJ (1997) Evidence for diminished functional expression of intestinal transporters in Caco-2 cell monolayers at high passages. *Pharm Res* 14:757–762. <https://doi.org/10.1023/a:1012150405949>
- Yu N, Wei S, Li M, et al (2016) Effects of Perfluorooctanoic Acid on Metabolic Profiles in Brain and Liver of Mouse Revealed by a High-throughput Targeted Metabolomics Approach. *Scientific Reports* 6:23963. <https://doi.org/10.1038/srep23963>
- Zhang H, Cui R, Guo X, et al (2016) Low dose perfluorooctanoate exposure promotes cell proliferation in a human non-tumor liver cell line. *Journal of Hazardous Materials* 313:18–28. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.03.077>
- Zhang J, Hong Y, Jiang L, et al (2020) Global Metabolomic and Lipidomic Analysis Reveal the Synergistic Effect of Bufalin in Combination with Cinobufagin against HepG2 Cells. *J Proteome Res* 19:873–883. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00681>
- Zhang S, Kang Q, Peng H, et al (2019) Relationship between perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate blood concentrations in the general population and routine drinking water exposure. *Environ Int* 126:54–60. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.02.009>
- Zheng F, Sheng N, Zhang H, et al (2017) Perfluorooctanoic acid exposure disturbs glucose metabolism in mouse liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 335:41–48. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.09.019>

Zheng P, Liu M, Yin H, et al (2020) Analysis of 58 poly-/perfluoroalkyl substances and their occurrence in surface water in a high-technology industrial park. *Environmental Pollution* 267:115381. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115381>

Résumé : L'acide perfluorooctanoïque (PFOA), qui est une substance d'origine humaine, est un des représentants principaux de la famille des composés per/polyfluoro-alkylés (PFAS). Ce composé est utilisé depuis les années 1950 dans de nombreuses applications industrielles et peut, à différentes étapes de son cycle de vie, être relargué dans l'environnement. Il y est très persistant et peut contaminer la chaîne alimentaire, avec une exposition avérée chez l'Homme. La toxicité fortement suspectée de ce composé pose aujourd'hui des questions majeures de santé publique. En 2020, l'EFSA a établi une Dose Hebdomadaire Tolérable de 4,4 ng/kg/semaine pour une combinaison de 4 molécules de la famille des PFAS incluant le PFOA, réduisant fortement les anciennes recommandations établies pour ce composé. De ce fait, une majorité des populations exposées à ce composé dépasse maintenant le nouveau seuil fixé. Plusieurs études suggèrent que le PFOA aurait des effets au niveau hépatique chez l'Homme. Cependant, des données plus complètes sur ses effets métaboliques sont nécessaires pour une évaluation plus précise des dangers associés à cette molécule. L'objectif principal de ce projet de thèse était d'explorer l'ensemble des voies métaboliques hépatiques altérées suite à l'exposition au PFOA, pour les scénarios d'exposition les plus représentatifs possibles de l'exposition Humaine. Pour cela, des approches de métabolomique permettant d'observer les effets de ce composé de manière globale ont été utilisées. La lignée cellulaire hépatique humaine HepaRG a été sélectionnée comme modèle d'étude pour ses fonctionnalités proches des hépatocytes primaires humains au niveau phénotypique, y compris sur le plan de l'expression des enzymes de biotransformation. Pour atteindre cet objectif, des développements méthodologiques ont été nécessaires afin d'optimiser plusieurs étapes clés des protocoles habituellement utilisés en métabolomique et pour les adapter au contexte spécifique de la mise en évidence des effets biologiques de ce type composé. En effet, l'étude des modulations métaboliques induites par des contaminants alimentaires tels que le PFOA doit être évaluée pour de faibles concentrations, et les effets engendrés peuvent être difficiles à mettre en évidence. Ces développements ont permis de considérablement limiter l'introduction de variabilité entre les échantillons, ainsi que d'augmenter le nombre de métabolites pouvant être observés sur le même échantillon biologique. L'ensemble de ces améliorations a été appliquées à l'étude des effets du PFOA par métabolomique. La métabolomique ciblée a été utilisée pour étudier les modulations de métabolites spécifiques impliqués dans les principales voies suspectées d'être affectées par ce composé (acides aminés, métabolites énergétiques et certaines classes de lipides). Des approches métabolomiques non ciblées ont permis d'observer les modulations d'autres métabolites potentiellement affectés par ce composé. Les résultats obtenus en métabolomique ciblée montrent une modulation de certains acides aminés, métabolites énergétiques et classes de lipides par le PFOA pour un temps d'exposition à court terme. Le citrate, le fumarate, l' α -cétoglutarate et le malate, qui sont des métabolites appartenant au cycle de Krebs semblent être particulièrement affectés lors d'une exposition à long terme. De plus, les analyses non ciblées réalisées suggèrent que d'autres voies métaboliques pourraient aussi être affectées. À terme, L'approche développée dans ce projet pourra être appliquée pour l'étude des effets d'autres composés de cette famille ainsi que pour d'autres contaminants alimentaires, permettant une meilleure caractérisation des dangers liés à ce type de composés.

Abstract: Perfluorooctanoic acid (PFOA), a substance of human origin, is one of the main representatives of the per/polyfluoro-alkylated compounds family (PFAS). PFOA has been used since the 1950's for numerous industrial applications and can be released into the environment at various stages of its life cycle. It is a very persistent substance that has also been demonstrated to contaminate the food-chain and for which human exposure was repeatedly demonstrated. The potential toxicity of this compound raises major public health issues. Very recently, EFSA has set a food exposure limit of 4.4 ng/kg/week for a combination of 4 molecules from the PFAS family including PFOA, strongly reducing the previous exposure recommendations established for this compound. As a result, for a majority of the population, exposure to this compound now exceeds the new guideline's limits. Several studies have suggested that PFOA has adverse hepatic effects in humans. However, more complete data on its metabolic effects are required to accurately assess the hazards associated with this compound. The main objective of this PhD project was to explore the hepatic metabolic pathways altered by PFOA exposure, based on in vitro doses as representative as possible of human exposure. For this purpose, we used metabolomic approaches, which allow the study of the global effects of xenobiotics. We chose the human hepatic cell line HepaRG as our central model, because it displays functionalities that are close to primary human hepatocytes both at the phenotypic level and regarding the expression of biotransformation enzymes. To achieve this objective, we performed methodological developments in order to optimize several key steps of in vitro metabolomics protocols, and adapt it to the specific context of toxicological studies focused on metabolic disruptors. Indeed, the study of metabolic modulations triggered by food contaminants such as PFOA must be assessed at low concentrations, and their effects can be difficult to demonstrate. These developments have enabled to considerably limit the between samples variability, as well as to increase the number of metabolites that can be observed in the same biological sample. All of these improvements have been applied to the metabolomics study of PFOA. Targeted metabolomics were used to study the modulations of specific metabolites involved in the main pathways suspected of being impacted by this compound (amino acids, energy metabolites and certain classes of lipids). Non-targeted metabolomics approaches were used to investigate the modulation of additional metabolic pathways. The results obtained in targeted metabolomics showed a modulation of a number of metabolites such as amino acids, energetic metabolites and some lipid classes by PFOA, for a short-term exposure time. Citrate, fumarate, α -ketoglutarate and malate, which are metabolites participating to the TCA cycle, appear to be particularly affected during long-term exposure. In addition, the non-targeted analyses suggest that other metabolic pathways could also be impacted by this compound. Ultimately, the approach developed in this project could be applied to study the effects of other compounds of this family as well as other food contaminants, allowing a better characterization of the hazards related to these chemicals.