



Une nouvelle génération de chambres de perméation, mise au point par le laboratoire du Pr Bruno ETO, Faculté de Médecine X. Bichat - Paris Diderot

Il est une technique bien connue des laboratoires d'électrophysiologie pour étudier le passage transmembranaire des molécules *in vitro* : la chambre de perméation, dite « chambre d'Ussing ». La méthode permet de mesurer les paramètres électriques des barrières épithéliales (intestin, poumon) et les autres barrières biologiques (peau, cornée et les autres muqueuses) et d'évaluer ainsi la viabilité fonctionnelle des cellules et leur capacité à réagir face aux différents effecteurs biologiques. Ces informations sont précieuses, notamment pour les industriels soucieux de répondre aux normes internationales de plus en plus strictes en matière de médicaments et d'aliments.

De tailles imposantes, les premières chambres d'Ussing trouvent également leurs limites dans une mise en œuvre souvent difficile et coûteuse. Mais aujourd'hui remarquablement améliorée et brevetée, une nouvelle génération d'appareils voit le jour. Entretien avec le Pr Bruno ETO, pharmacologue, Laboratoire TransCell-Lab au sein de la Faculté de médecine Bichat à Paris, inventeur de ces nouvelles chambres de perméation...

La Gazette du Laboratoire (LGdL) : « Bonjour, pourriez-vous nous rappeler ce qu'est une chambre d'Ussing, son mode de fonctionnement et ses domaines d'application ? »

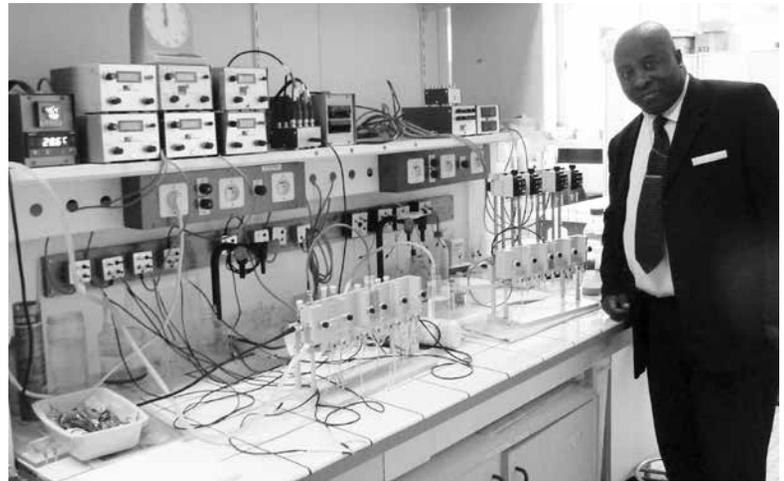
Bruno ETO (B. E.) : « La chambre d'Ussing emprunte son nom de son créateur H.H. USSING, un médecin danois qui en 1950 publia une méthode pour étudier le flux d'ions sodium (Na⁺) à travers une peau de grenouille et déterminer ainsi sa part d'implication dans le potentiel membranaire. La technique consiste à annuler la différence de potentiel de part et d'autre de la membrane, de manière à supprimer le transport passif des ions pour observer uniquement le flux net actif, image du courant résultant dans les conditions de court-circuit.

La chambre d'Ussing est composée à la base de deux compartiments séparés par le tissu perméable à étudier. Les deux compartiments contiennent une solution physiologique et

isolent ainsi les côtés lumineux (ou muqueux) et séreux (côté en contact avec le sang) du tissu en vue de reproduire au mieux le principe de barrière sélective. Ils sont habituellement usinés dans du plexiglas (polyméthacrylate de méthyle), apprécié pour sa transparence et son comportement vis-à-vis des tissus biologiques. La solution physiologique est maintenue à une température constante de 37°C et continuellement oxygénée et mélangée par un bullage de carbogène (95% O₂ - 5% CO₂). Dans ces conditions environnementales, la plupart des tissus gardent une viabilité fonctionnelle supérieure à deux heures, ce qui permet d'étudier les transports actifs et passifs transmembranaires. En complément des analyses classiques de perméabilité, la chambre d'Ussing couplée à des clamps offre le moyen de vérifier l'état du tissu biologique par la mesure de paramètres électriques. Pour ces analyses, elle se comporte comme une cellule électrochimique avec ses électrodes de références et ses électrodes de mesure. La chambre de perméation permet ainsi l'étude du passage des médicaments, des xénobiotiques et des électrolytes au travers de barrières physiologiques de différentes natures : épithélium pulmonaire, épithélium intestinale, cuticules de plantes, cornée, peau, cultures cellulaires, vaisseaux sanguins »

LGdL : « Pourquoi avoir cherché à modifier les chambres de perméation? Quelles étaient leurs limites et quelles améliorations y avez-vous apportées ? »

B. E. : « Les premières chambres d'Ussing permettent de caractériser les paramètres électrophysiologiques des barrières biologiques, mais la plupart font appel à un protocole opérationnel strict, souvent lourd, complexe et onéreux. Certains de ces systèmes encore utilisés aujourd'hui nécessitent 10 à 12 ml de solution physiologique par réservoir (de chaque côté de la membrane); un volume important et un coût excessif pour diluer les principes actifs très onéreux tels que les hormones d'origine humaine, des produits marqués aux radioéléments, etc. dont quelques milligrammes représentent plusieurs milliers d'euros ! La précision de mesure des chambres de perméation classiques reste par



ailleurs limitée et leur taille, particulièrement imposante. Nous avons donc cherché à optimiser le fonctionnement et la performance de ces équipements, notamment au travers d'une meilleure circulation des fluides à l'intérieur de la chambre, tout en miniaturisant l'ensemble ».

Les chambres d'Ussing de nouvelle génération mises au point par le Pr ETO et son équipe ont ainsi été spécialement étudiées pour être faciles d'utilisation, avec des réservoirs de contenance réduite et des résultats de grande précision.

« Nous sommes aujourd'hui en mesure de proposer des chambres de perméation pour petits animaux, rats, cobayes et lapins, porcs et grands animaux, ou encore, cultures cellulaires... tout comme des chambres adaptées à un travail direct sur biopsies humaines et animales d'un diamètre de 1 à 2,5 mm », ajoute le Pr ETO. « La méthode a beaucoup gagné en sensibilité : de 1 µA au mieux pour les systèmes classiques à 10 nA, aujourd'hui ces nouvelles chambres sont les seules au monde à atteindre une telle sensibilité de courant ! »

Huit à dix fois plus compactes que les modèles classiques, les chambres de perméation mises au point par le laboratoire du Pr ETO sont dotées de réservoirs de 1 à 4 ml, contre 10 à 12 ml précédemment voir plus ; un atout significatif en termes de compacité, mais aussi en coût de fonctionnement, du fait de la diminution des volumes d'échantillons nécessaires. Ces solutions modernes bénéficient par ailleurs d'une régulation électronique de la température et d'un programme spécifique et

sécurisé pour l'acquisition et l'enregistrement des valeurs expérimentales sur 1 à 16 canaux. Autre point fort : un système d'oxygénation intégré et portatif qui offre à ces équipements une grande mobilité. Ainsi très faciles à mettre en œuvre, les nouvelles chambres de perméation réduisent à trois heures la durée de manipulations qui jusqu'à lors exigeaient une journée entière...

A noter par ailleurs le développement par cette même équipe d'électrodes de Calomel miniaturisées et incassables, brevetées en 2002, et d'un clamp de mesures précis, sensible et simple d'utilisation (*plug & play*) tout particulièrement adapté aux chambres de perméation d'Ussing.

LGdL : « A quelles applications se destine cette nouvelle génération de chambre de perméation ? »

B. E. : « Grâce aux chambres de perméation de nouvelle génération, les études *in vitro* sont étroitement corrélées avec les études cliniques, ce qui permet de réduire d'un an en moyenne le développement galénique des médicaments. Parmi les applications phares de ces systèmes, se distinguent donc en premier lieu :

- la pharmacologie, avec l'étude du passage des ions, de l'eau, des électrolytes, des nutriments et des xénobiotiques au travers des barrières intestinale, pulmonaire ou des autres muqueuses (vaginale, buccale, nasale), de la peau, de la cornée... ainsi que l'analyse du métabolisme des médicaments et des expressions des transporteurs membranaires et nutriments ;
- la galénique : évaluation de



KAPA Library Preparation Kits & SeqCap EZ Reagents

Une solution complète pour la capture de séquences

Un workflow performant et simplifié

L'expertise des bibliothèques KAPA associée à la performance des produits SeqCap EZ

Minimisez la quantité d'échantillon

Moins de 10 ng d'ADN de départ

Améliorez vos résultats de séquençage

Une couverture plus uniforme grâce à la diminution des biais de PCR des régions AT et GC-rich

Optimisez vos coûts

Multiplexage jusqu'à 24 échantillons, des conditionnements de réactifs adaptés



NIMBLE DESIGN, NIMBLEGEN et SEQCAP sont des marques déposées de Roche.

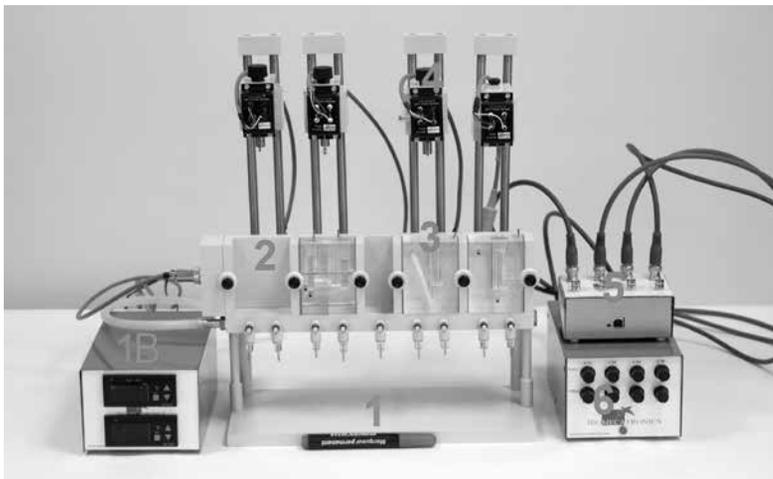


KAPA est une marque déposée de Kapa Biosystems, Inc.

Roche Diagnostics France
2, avenue du Verdon
38249 Meylan, France

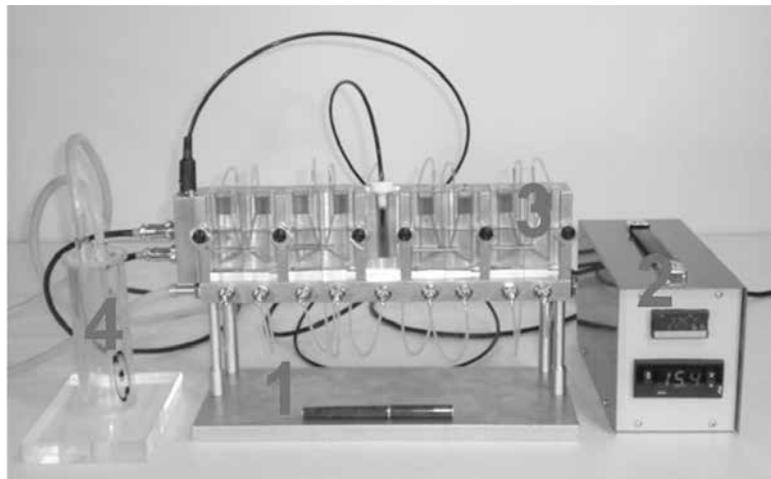
www.rochediagnostics.fr





L'appareil à organe isolé comprend :

- 1) portoir chauffant dont la température est régulée électroniquement par le régulateur de température 1B.
- 2) emplacement de la chambre à organe isolé
- 3) volume variant de 2mL à 5 mL.
- 4) capteur de mouvement avec assesseur et vis micrométrique.
- 5) carte d'acquisition de données USB avec câbles BNC,
- 6) amplificateur de signal à 4 voies amplificateur (déplacement de la ligne basale du signal et amplification du signal)



Équipement pour chambre d'Ussing comprenant :

- 1) portoir chauffant dont la température est régulée électroniquement par le régulateur de température 2)
- 3) emplacement de la chambre de mesure avec de volume variable (2 mL à 5 mL)
- 4) humidificateur de carbogène

la formulation des candidats médicaments (biodisponibilité), étude des vecteurs des médicaments (nanoparticules), études des interactions et transport au travers de la barrière intestinale, étude du polymorphisme des médicaments (génériques)...

→ la toxicologie et l'agro-alimentaire, avec l'étude du passage des métaux lourds, des herbicides, fongicides, insecticides et autres xénobiotiques sur les plantes, légumes, champignons, épicarpe des fruits, mollusques, insecte...

→ le diagnostic médical, notamment de la mucoviscidose et des allergies alimentaires, la malabsorption des nutriments.

→ la cosmétologie : caractérisation du passage transcutané... »

LGdL : « Comment avez-vous procédé pour assurer le développement, la production et la commercialisation de ces nouvelles chambres de perméation ? »

B. E. : « Chercheur avant tout, spécialisé dans la mise au point de médicaments à base d'extraits de plantes [biophytomédicaments] grâce à la polyphytothérapie alternative et combinatoire, j'ai pu approfondir mes connaissances dans le cadre de plusieurs années d'exercice pour le compte de grands groupes pharmaceutiques en France et aux Etats-Unis, sur les mécanismes de passage de médicaments à travers la barrière intestinale.

De cette expérience est né mon intérêt pour les chambres de perméation d'Ussing, avec la création en 2002 d'une société de services : le laboratoire TBC, hébergé au sein de l'Université Denis Diderot - Paris 7. Initialement dédiée au sav, notre structure en est rapidement venue à développer sa propre activité de R&D afin de moderniser la technique. Deux brevets sont déposés, en 2002 et en 2009, avec le lancement en 2005 de la production et de la commercialisation de ces nouvelles chambres de perméation par la société Biomécatronics, fondée à Béthune ».

D'ores et déjà implantées dans toute France, mais aussi dans le reste de l'Europe et aux Etats-Unis, les premières chambres de perméation conçues par le laboratoire TBC, produites et vendues par Biomécatronics, équipent pour la plupart des laboratoires de R&D pharmaceutiques, des centres de recherche académiques et des hôpitaux.

« Grâce à ces nouveaux équipements, nous avons réussi à mettre au point plusieurs biomédicaments », remarque le Pr Bruno ETO. « Huit produits ont ainsi été développés et quinze brevets déposés. Les premières autorisations de mise sur le marché ont été obtenues en 2007 en Afrique de l'Ouest, en Afrique centrale) En Europe ont développe aussi

des compléments alimentaires aux plantes (10 enregistrés en France et en Allemagne.)

LGdL : « Quels sont désormais vos prochains objectifs et perspectives de développement ? »

B. E. : « Nous poursuivons une R&D active et entendons continuer à répondre aux demandes spécifiques de nos clients, comme nous l'avons fait par exemple en 2012 en développant un système d'étude des organes isolés, à partir des mêmes support, carte acquisition et boîtier de chauffage que ceux de nos chambres de perméation.

Notre activité de service est par ailleurs toujours gérée par Biomécatronics à Béthunes, avec cette même volonté d'accompagner les laboratoires au plus près de leurs attentes, depuis la définition du besoin, le choix du matériel et son installation, jusqu'à la formation des utilisateurs et l'assistance gratuite pendant un an. Formations, conférences, études en sous-traitance, travaux de collaboration et de recherche dans le domaine du passage des molécules au travers des membranes biologiques, demeurent au cœur de nos objectifs ».



Comparaison entre le clamp électronique de WPI (1) à deux voies et le clamp Biomécatronics à une voie (2) et (3)

Le nombre de chambres d'Ussing classiques actuellement en fonctionnement est évalué à 200 000 aux Etats-Unis et 5 à 10 000 en France. Les besoins mondiaux sont estimés à plus de 500 000 unités (30 000 en France) sur quelques années. « Nous cherchons donc aujourd'hui à étendre la distribution de notre gamme de produits, notamment en Europe et

sur le continent nord-américain, en collaboration avec des sociétés et/ou commerciaux indépendants », conclut Bruno ETO.

S. DENIS

Pour en savoir plus :
courriel@biomecatronics.com
www.biomecatronics.com
Tél. : +33 9 63 297 487 / +33 982 350 287.

Auriez-vous besoin d'un MiniVap™ ?

Bien entendu, il ne vous viendrait pas à l'idée d'utiliser un sèche-cheveux pour évaporer vos échantillons de chromatographie sur une seule microplaque, mais vous pourriez bien en avoir assez d'attendre votre tour pour utiliser pour cela le gros évaporateur de votre service. Si tel est votre cas, vous avez besoin d'un MiniVap de Porvair. Cet appareil est petit, rapide, adaptable, et n'endommagera pas vos échantillons. Allez sur www.telechargements.microplaques.fr pour de plus amples informations.



porvair sciences

Téléphone +33 (0) 5.63.03.19.89
Email: ventes@microplaques.fr
www.microplaques.fr