

Soutenance

Stage Master 1

Option : Production Végétale et Industries
Agroalimentaires

Sujet de Stage

Evaluation de la biodisponibilité des acides aminés des protéines de lait par méthodes isotopiques chez le rat

Présenté par :

Lorène AKISSOE

Maître de stage : Prof. Claire GAUDICHON

Tuteur de stage : Dr. Manuella CATTEROU

Plan

- ❖ **Introduction**
- ❖ **Objectifs**
- ❖ **Matériels et Méthodes**
- ❖ **Résultats et Discussions**
- ❖ **Conclusion et Perspectives**

INTRODUCTION

Introduction

- Protéines : Nutriments nécessaire aux fonctions physiologiques de l'organisme
 - Structure des protéines
 - Sources de protéines : Origine animale et végétale
 - Problématique liée à l'apport → Ressources limitées



Introduction (suite)

- Utilisation de nouvelles sources de protéines : Question importante à résoudre
- Evaluation de la qualité des protéines → Contraintes Méthodologiques
- Marquage des protéines aux isotopes stables ^{15}N et ^{13}C
- Méthodes de marquage : marquage intrinsèque ou extrinsèque

Introduction (fin)

- Etude de la digestibilité iléale des protéines → Pose de sonde nasale (Méthode Invasive)
- Développement de méthodes moins invasive : Prélèvements sanguins
- Recommandation de la FAO : Caractériser la digestibilité des acides aminés individuels
- Mise au point de méthode analytique pour l'étude des AA individuels



OBJECTIFS

Objectifs

Objectif du Projet de recherche

Développement d'une méthode multi-traceurs peu invasive pour estimer la biodisponibilité des acides aminés individuels par comparaison des ratios $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ou $^{13}\text{C}/^2\text{H}$ des protéines ingérées et des acides aminés plasmatiques.

Objectifs du Stage

Développer une méthode analytique permettant de mesurer les enrichissements des isotopes ^{13}C et ^{15}N dans les AA par GC-C- IRMS

Etudier la biodisponibilité des AA individuels des protéines du lait de chèvre et de la spiruline chez le rat

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

➤ Repas

- Lait de chèvre marqué au ^{15}N
- Spiruline marqué à ^{13}C

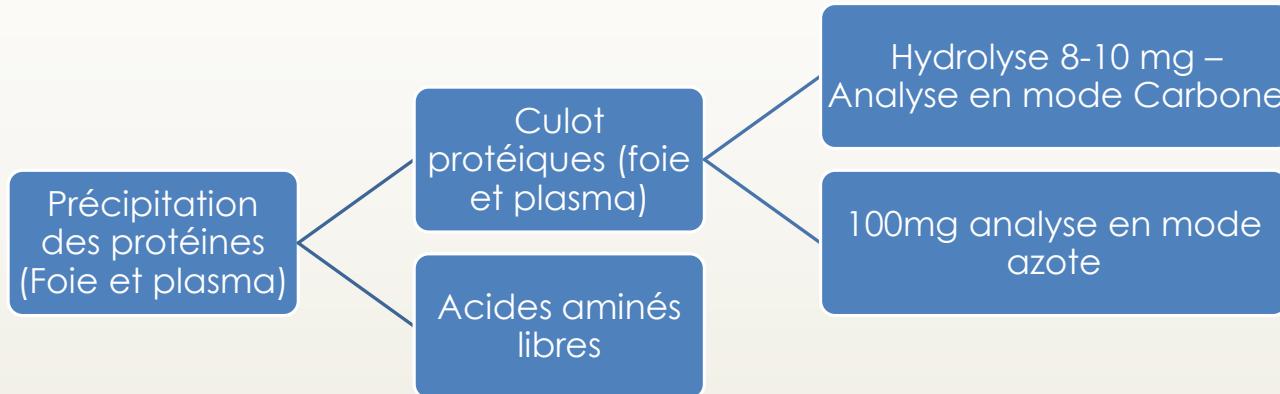
Système digestif de l'homme similaire à celui du rat

12 rats séparés en 2 groupes :
-Groupe de 6h
-Groupe de 4h

- **Organes prélevés:** Foie ; Estomac ; Intestin grêle ; Caecum ; Colon et le Plasma.
- **Echantillons analysés:** Foie ; Caecum ; Colon et le Plasma.

Matériels et Méthodes (suite)

➤ **Traitements préliminaires** : Broyage des tissus, précipitation des protéines ; lyophilisation ; Hydrolyse des culots protéiques,



EA-IRMS

- Mesurer le pourcentage total en ^{15}N et/ou en ^{13}C

Analyseur
Elémentaire (EA)

Spectromètre de
Masse (IRMS)

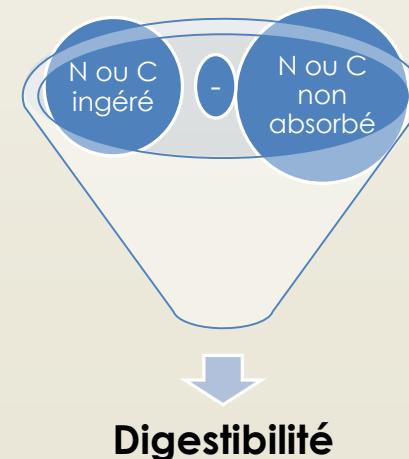
- déterminer l'enrichissement global en ^{15}N et en ^{13}C

Matériels et Méthodes (suite)

- **Calcul du pourcentage** → Standard externe (atropine)
- **Calcul de l'enrichissement** → Gaz de référence et Standard externe (acide glutamique)
- **Expression de l'enrichissement** : Données brutes sous forme de delta per mille et les résultats peuvent exprimés sous forme de Atom Percent ou Atom Percent Excess

$$\Delta \text{‰} = (\text{R}_e / \text{R}_{\text{std}} - 1) * 1000$$

- **Calcul de digestibilité**



Matériels et Méthodes (suite)

GC-C-
IRMS

GC-C-IRMS

- Mesurer l'enrichissement des différents composés dans un mélange

➤ **Développement de méthodes :** Dérivatisations de Mix de 18 AA standards – 2 colonnes

- Alkyl Chloroformate : ECE⁽¹⁾ et MCE⁽²⁾
- Acétylation : NAP⁽³⁾ et NACME⁽⁴⁾

Dérivatisations

Colonnes

- RTX-17 : Moyennement polaire
- Wax : Polaire

(1) : Ethyle Chloroformate ; (2) : Méthyle Chloroformate ; (3) : N- acétyle Propyle ; (4) : N- acétyle Méthyle

Matériels et Méthodes (suite)

- Analyse des échantillons biologiques par GC-C-IRMS

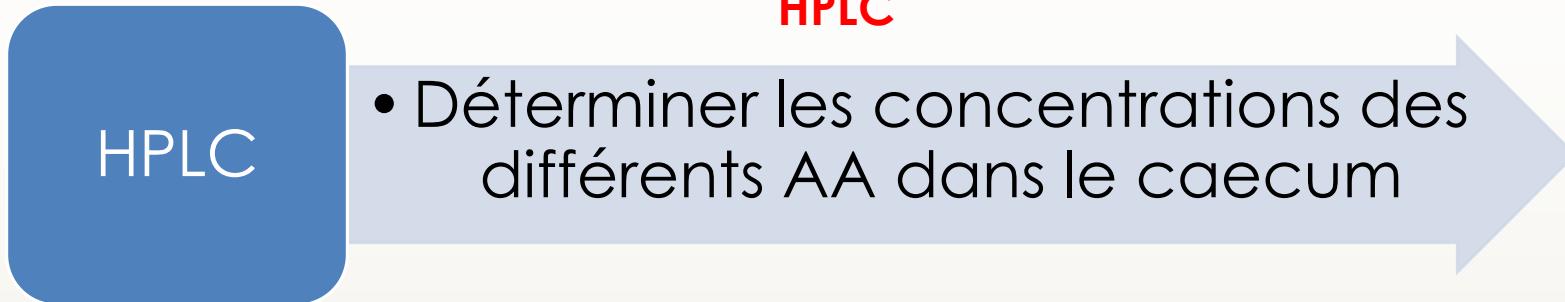
- **Enrichissement en mode ^{13}C**

Environ 10mg de l'échantillon biologique

- **Enrichissement en mode ^{15}N**

- Environ 100mg de l'échantillon biologique
 - Colonne épaisse avec la phase stationnaire de 0.5 μm
 - Azote liquide pour piéger l'eau

Matériels et Méthodes (suite)



- Dérivation pré-colonne à l'OPA
- Détection en mode fluorescent
- Elution : Utilisation d'un gradient avec 2 tampons → Tampons A et B
- Séparation chromatographique sur une colonne Symmetry C18 (Waters)

Matériels et Méthodes (fin)

- Hydrolyse de 10mg de caecum dans 2ml de HCl 6M avec ajout de 10µl l'acide γ -aminobutyrique (GABA)
- Détermination de la concentration dans le caecum à l'aide d'une gamme de dilution d'un mélange de standard
- **Analyse des données**
 - Logiciel XLSTAT
 - Test t de Student sur les 2 groupes de rats
 - Résultats exprimés sous forme de moyenne \pm Ecart-type

Résultats & Discussion

Digestibilité des différentes protéines

➤ Pourcentage d'azote exogène et de carbone

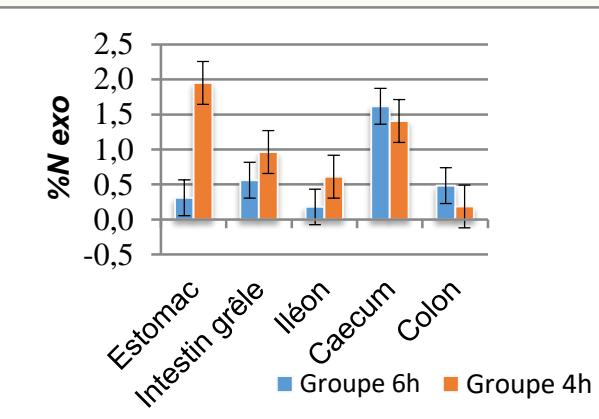


Figure 1 : Pourcentage d'azote exogène

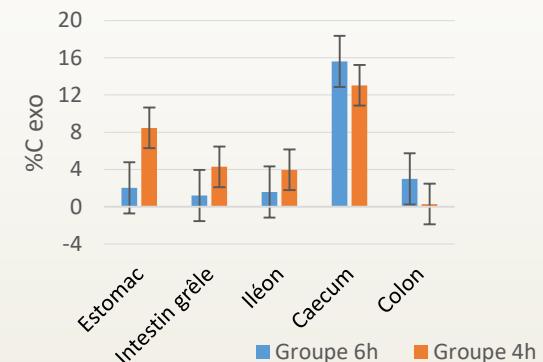


Figure 2 : Pourcentage de carbone exogène

↓

Digestibilité protéines du lait	
Groupe de 6h	Groupe de 4h
$97,86 \pm 0,40 \%$	$97,89 \pm 0,29$
P-value=0,89	

↓

Digestibilité protéines de la spiruline	
Groupe de 6h	Groupe de 4h
$79,16 \pm 6,44 \%$	$83,51 \pm 2,856$
P-value = 0,205	

Digestibilité des différentes protéines

- Comparaison des digestibilité des deux protéines

Protéines du lait	Protéines de la spiruline
$81,28 \pm 4,82\%$	$97,82 \pm 0,33\%$
P-value < 0,0001	

- Comparaison de nos résultats avec d'autres études

Sources de protéines	Digestibilité
Lait de vache	95% (Gaudichon et al., 1999)
Soja	91-92% (Mariotti et al., 2000)
Pois	90% (Mariotti et al., 2001)
Colza	84% (Bos et al., 2007)

Développement de méthodes par GC-C-IRMS

- Dérivatisation par acétylation et par alkyl chloroformate sur la Colonne Wax

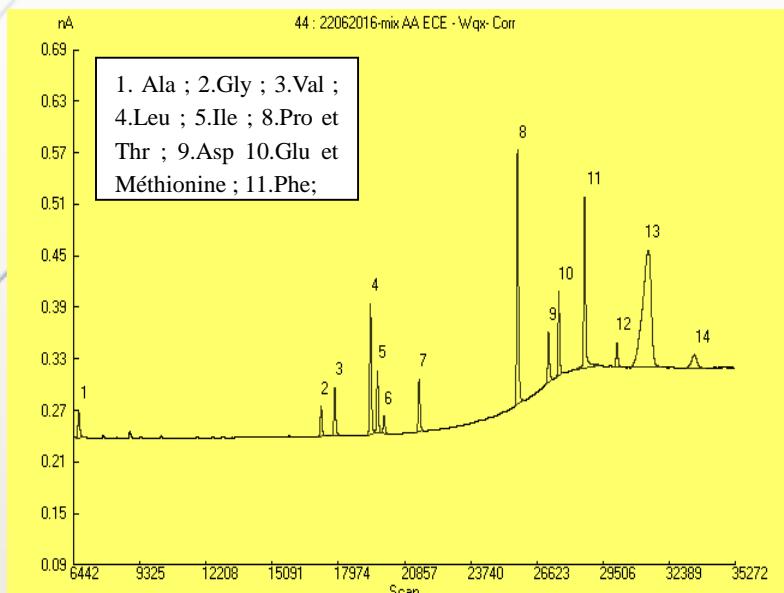


Figure 3: Dérivation par éthyle chloroformate (ECE)



Observation : 11 AA identifiés sur 18.

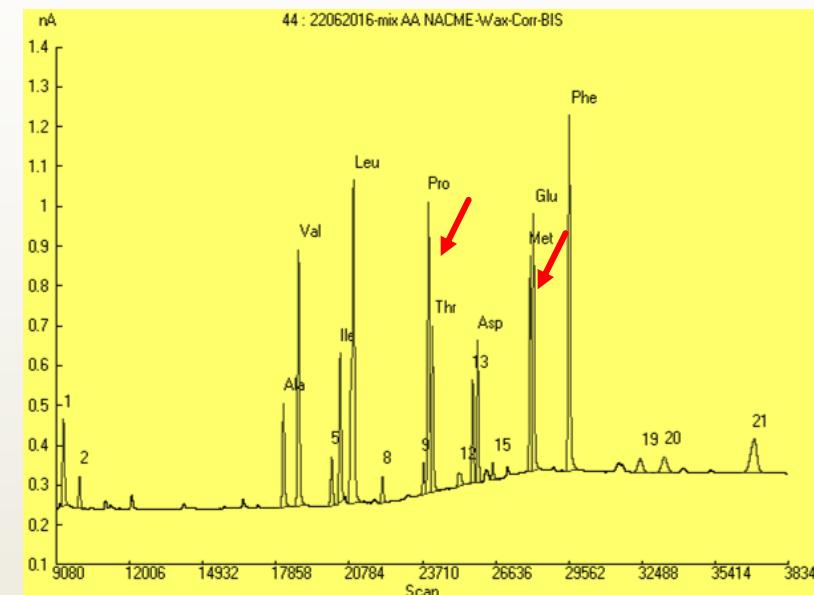


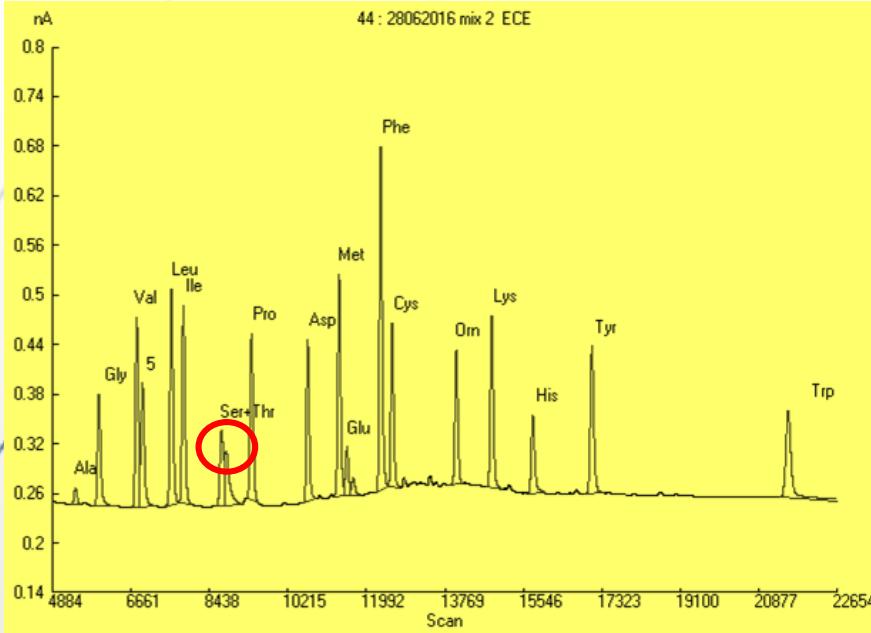
Figure 4 : Dérivation par acétylation NACME



Observations:
-9 AA identifiés sur 18;
-Co-élution : Pro et Thr ; Glu et Met

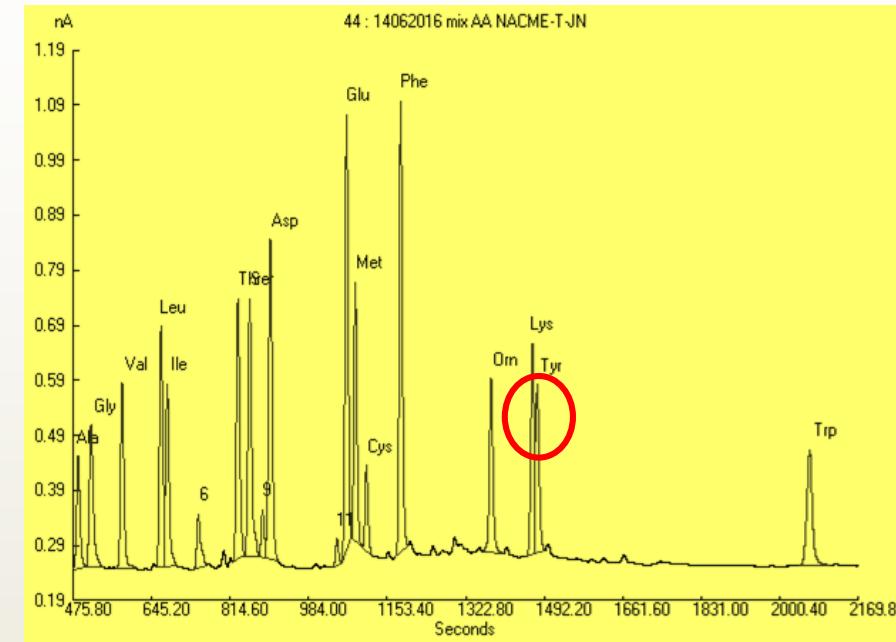
Développement de méthodes par GC-C-IRMS

- Dérivatisation par acétylation et par alkyl chloroformate sur la Colonne RTX-17



Observations :

- Bonne séparation de 16 AA
 - Co-élution de 2 AA : Ser et Thr



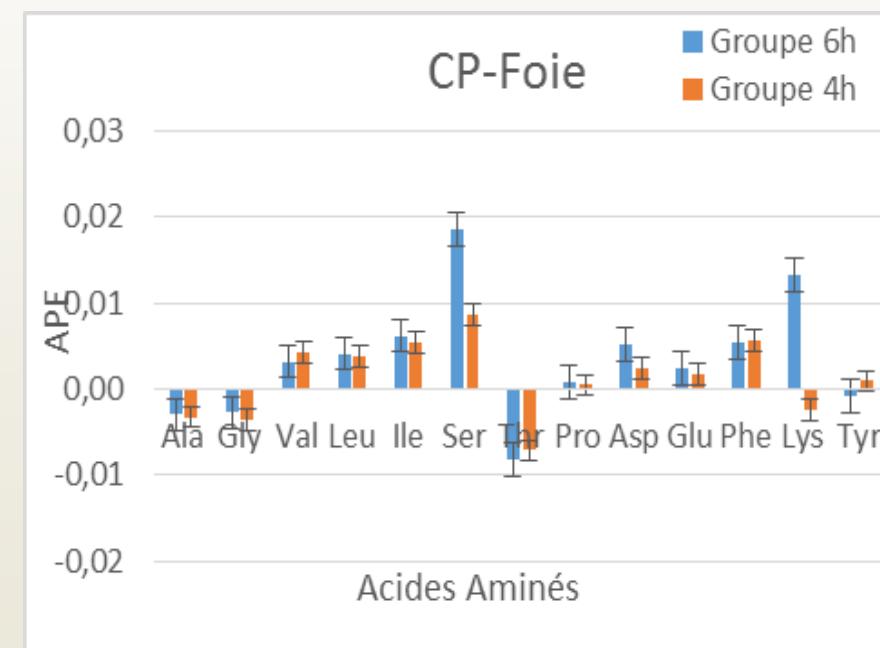
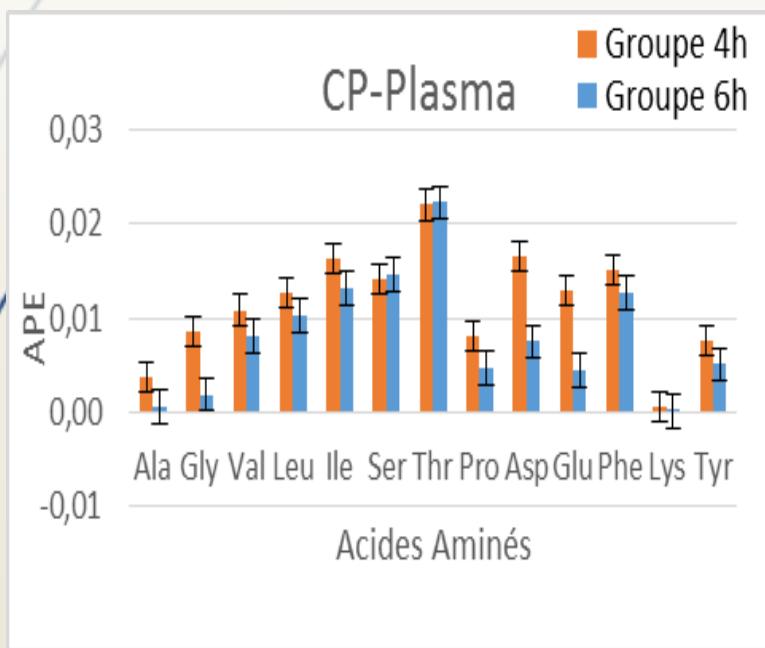
Observations :

- Bonne séparation de 16 AA
 - Co-élution de 2 AA : Lys et Tyr

Dérivatisation ECE et la colonne RTX-17 ont été choisies pour l'analyse des échantillons biologiques

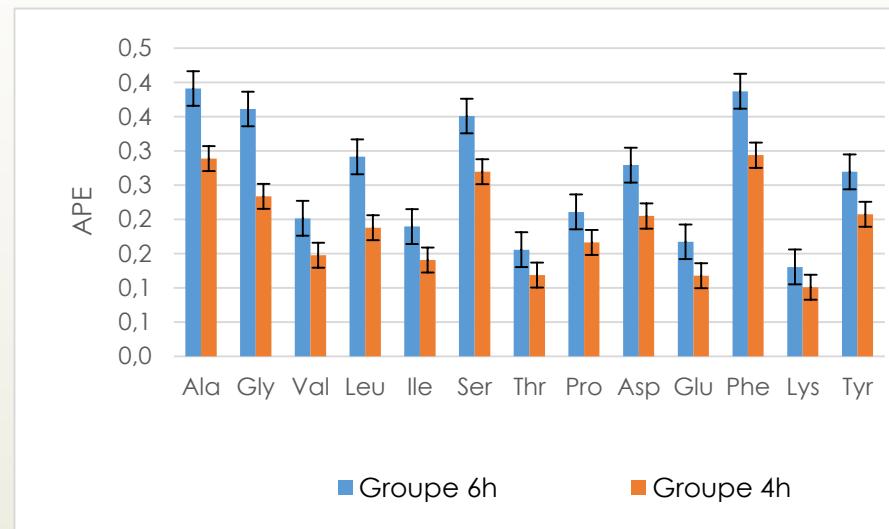
Analyses des échantillons biologiques par GC-C-IRMS

- Chromatogramme des échantillons biologiques similaires à celui du mix de AA standards
- Enrichissements des AA individuels en mode ^{13}C exprimés en Atom Percent Excess (APE)



Développement de méthodes par GC-C-IRMS

- Enrichissements des AA individuels en mode ^{13}C exprimés en Atom Percent Excess (APE)



- L'analyse des AA libres n'a pas pu réalisée

Hypothèse : Les traitements préliminaires réalisés sur les AA libres seraient à la base des difficultés rencontrées lors de leur analyse

Développement de méthodes par GC-C-IRMS

- Lien entre les deux groupes de rats pour chaque acide aminé.

Acides Aminés	P-value		
	Plasma	Foie	Caecum
Alanine	0,252	0,496	0,100
Glycine	0,226	0,424	0,003*
Valine	0,047*	0,539	0,027*
Leucine	0,014*	0,197	0,037*
Isoleucine	0,028*	0,071	0,053
serine	0,782	0,313	0,031*
Thrénanine	0,782	0,521	0,050
Proline	0,013*	0,262	0,037*
Aspartate	0,359	0,396	0,032*
Glutamate	0,372	0,792	0,076
Phénylalanine	0,003*	0,612	0,035*
Lysine	0,345	0,342	0,021
Tyrosine	0,005*	0,060	0,073*

(*: Différence significative)

Développement de méthodes par GC-C-IRMS

- Enrichissements des AA individuels en mode ^{15}N exprimés en Atom Percent Excess (APE)

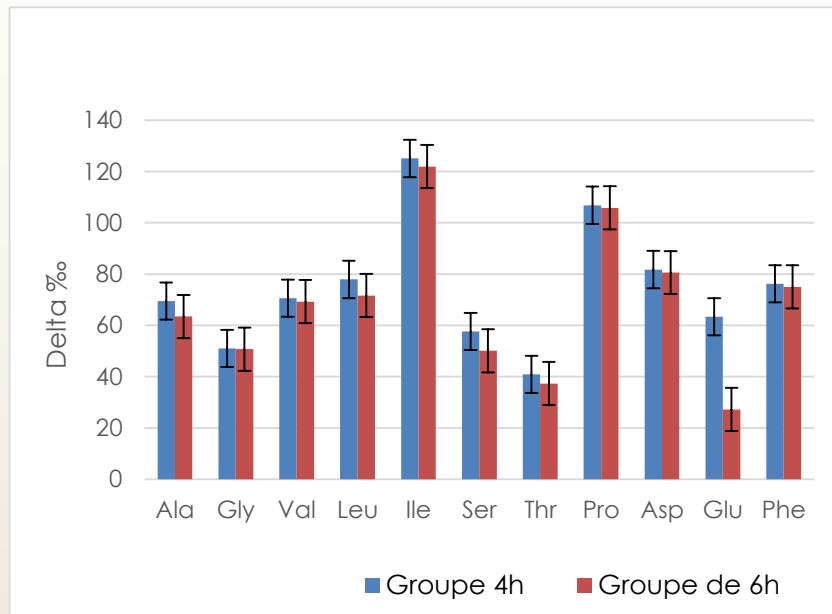


Figure : Enrichissement en ^{15}N dans le plasma

- Problèmes de performances chromatographique et difficulté lors de l'intégration

Dosage de concentration par HPLC

- Chromatogramme et concentrations des différents AA

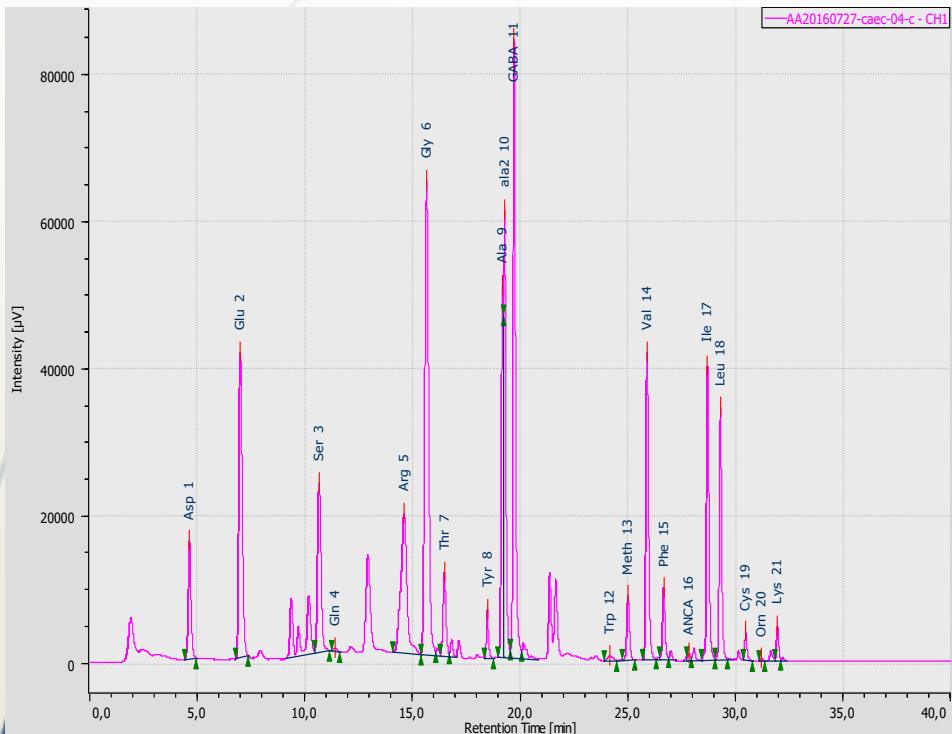


Figure : Chromatogramme d'un échantillon de caecum

Pour certains AA l'aire du pic détecté avait une valeur inférieure à celle obtenue avec le point « 0 » de la gamme de dilution

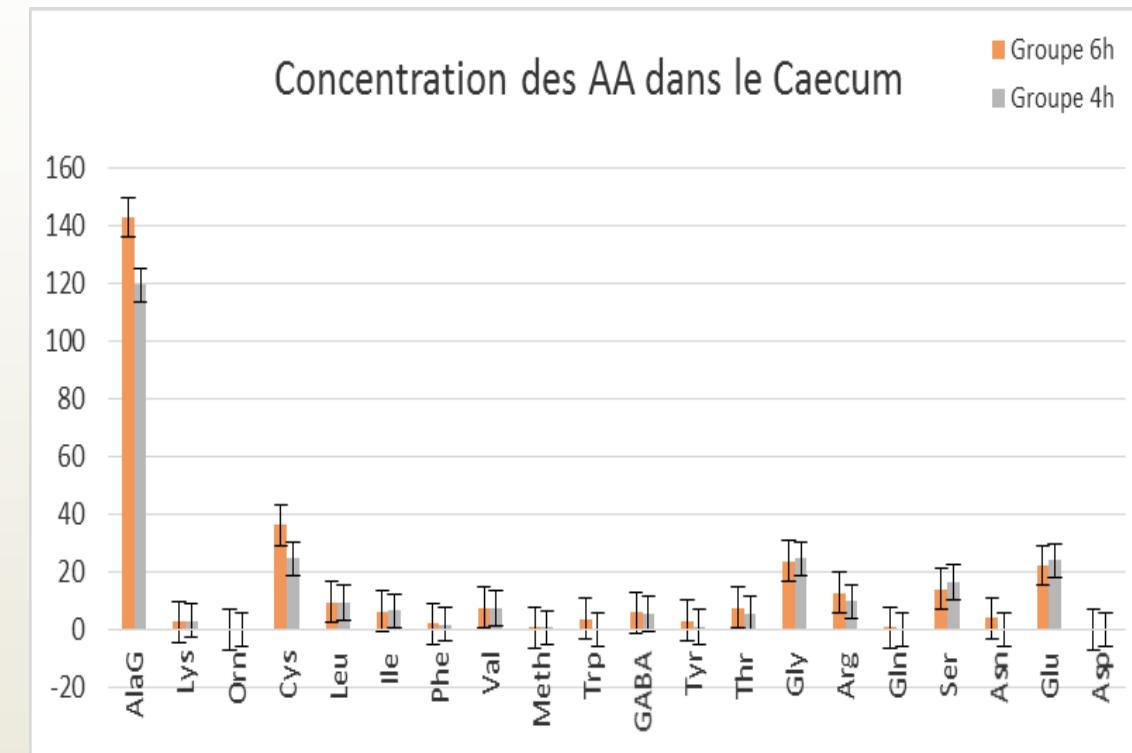


Figure : Concentration des différents AA dans le caecum

Conclusion & Perspectives

Conclusion

- La digestibilité des protéines du lait était supérieure à celle de la spiruline
- Mis au point d'une méthode pour la mesure des enrichissements isotopiques en des acides aminés standards par GC-C-IRMS
- Choix de la dérivation par alkyl chloroformate ECE pour l'analyse des échantillons biologiques

Conclusion

- En mode carbone les enrichissements n'étaient pas uniforme
- En mode azote les enrichissements plus uniforme par rapport au carbone
- Concentration des AA dans le caecum a été déterminée → calculer la digestibilité des AA individuels

Perspectives

➤ Développement de méthodes par GC-C-IRMS

- Mettre au point une procédure pour l'analyse des AA libres par GC-C-IRMS
- Développer méthodes pour l'analyse en mode azote pour performance chromatographique

➤ Détermination de concentration pour l'analyse sur HPLC

- Envisager l'utilisation d'un standard interne d'injection afin de pouvoir appliquer la correction à la variabilité du rendement de la réaction de dérivation
- Etudier la dynamique de la réaction de dérivation à l'OPA pour vérifier son efficacité

Remerciements



Madame Claire GAUDICHON

Madame Nadezda KHODOROVA

Monsieur Laurent BROUDISCOU

*MERCI DE VOTRE AIMABLE
ATTENTION*