

# 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

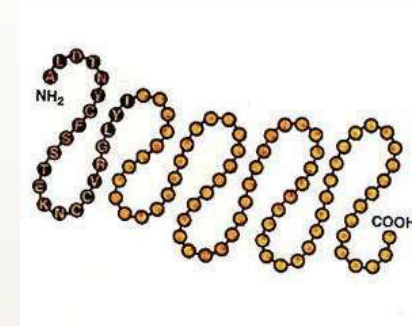
- ❖ **Introduction**
- ❖ **Objectifs**
- ❖ **Matériels et Méthodes**
- ❖ **Résultats et Discussions**
- ❖ **Conclusion et Perspectives**

# 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  $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}$
- 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 ingérés et des acides aminés plasmatiques.

## Objectifs du Stage

Développer une méthode analytique permettant de mesurer les enrichissements des isotopes  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$  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  $^{15}\text{N}$
- Spiruline marqué à  $^{13}\text{C}$

Système digestif de l'homme similaire à celui du rat

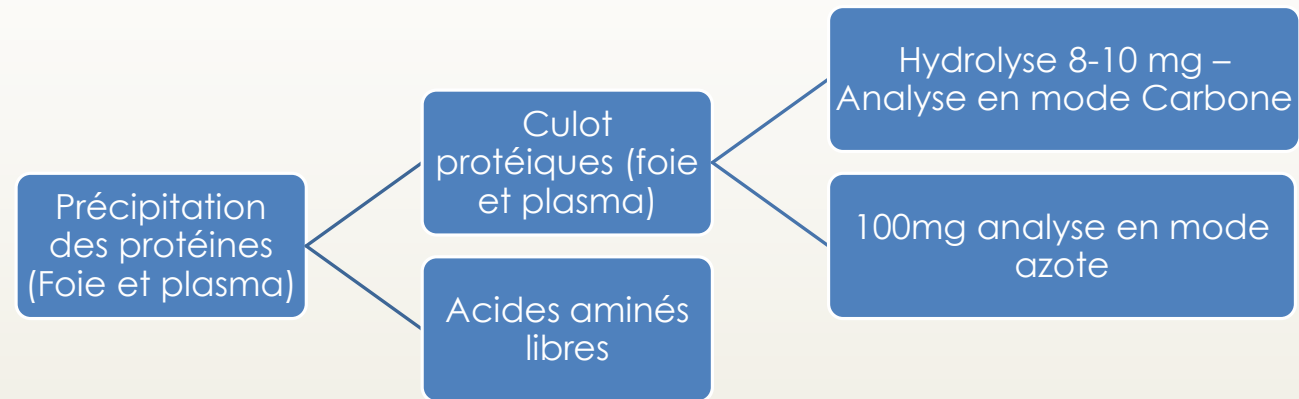


12 rats séparés en 2 groupes :  
-Groupe de 6h  
-Groupe de 4h

- **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

Analyseur  
Elémentaire (EA)

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

Spectromètre de  
Masse (IRMS)

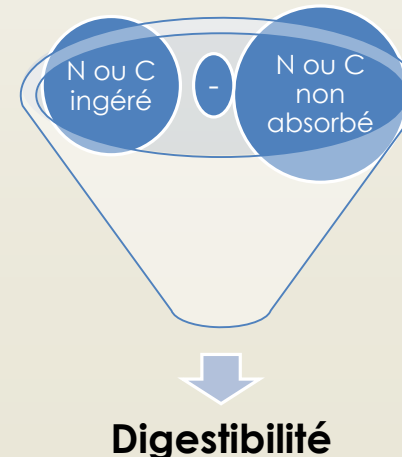
- déterminer l'enrichissement global en  $^{15}\text{N}$  et en  $^{13}\text{C}$

# 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 être exprimés sous forme de Atom Percent ou Atom Percent Excess

$$\text{Delta } \text{‰} = (\text{Re}/\text{Rstd}-1)*1000$$

- **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<sup>(1)</sup> et MCE<sup>(2)</sup>
- Acétylation : NAP<sup>(3)</sup> et NACME<sup>(4)</sup>

Dérivatisations

Colonnes

- RTX-17 : Moyennement polaire
- Wax : Polaire

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

# Matériels et Méthodes (suite)

➤ Analyse des échantillons biologiques par GC-C-IRMS

- **Enrichissement en mode  $^{13}\text{C}$**

Environ 10mg de l'échantillon biologique

- **Enrichissement en mode  $^{15}\text{N}$**

- Environ 100mg de l'échantillon biologique
- Colonne épaisse avec la phase stationnaire de  $0.5\ \mu\text{m}$
- Azote liquide pour piéger l'eau

# Matériels et Méthodes (suite)

HPLC

HPLC

- Déterminer les concentrations des différents AA dans le caecum

- 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 ± Ecart-type

# Résultats & Discussion

# Digestibilité des différentes protéines

- Pourcentage d'azote exogène et de carbone

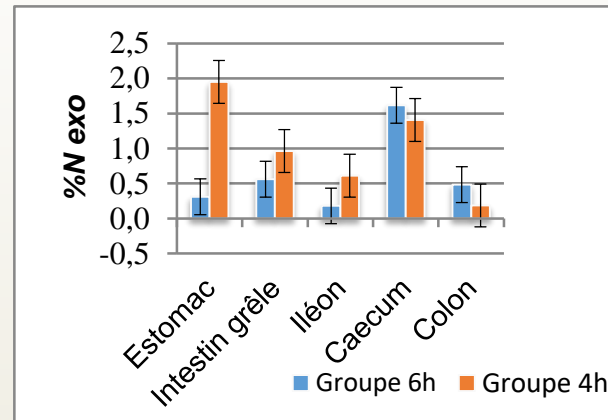


Figure 1 : Pourcentage d'azote exogène



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

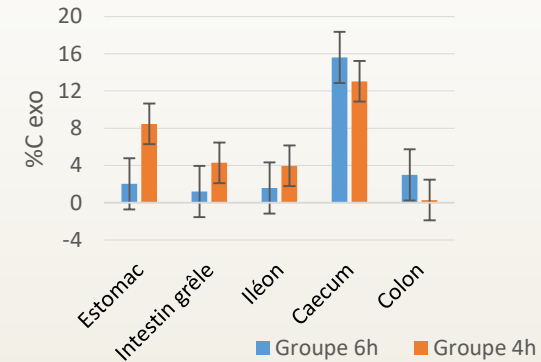


Figure 2 : Pourcentage de carbone exogène



Digestibilité protéines de la spiruline	
Groupe de 6h	Groupe de 4h
79,16 ± 6,44 %	83,51 ± 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 ± 4,82%	97,82 ± 0,33%
P-value < 0,0001	

- Comparaison de nos résultats avec d'autres études

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

# Développement de méthodes par GC-C-IRMS

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

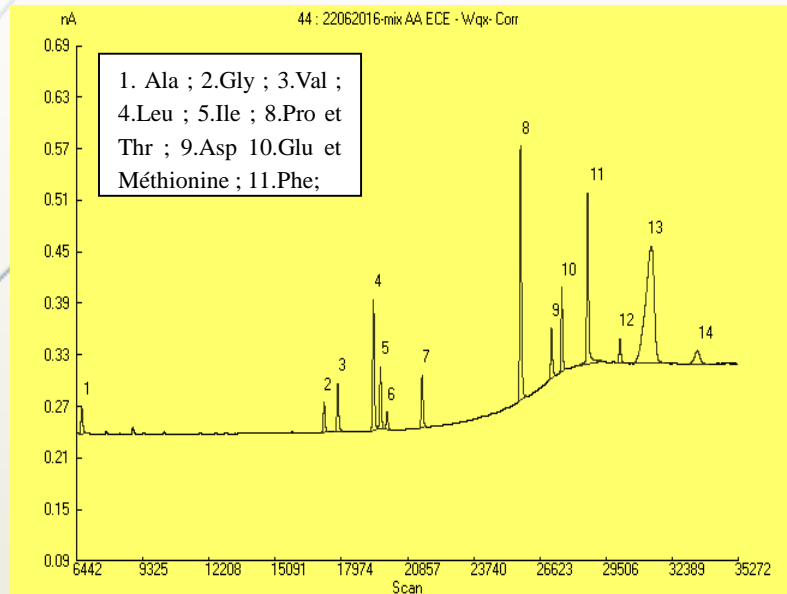


Figure 3: Dérivation par éthyle chloroformate (ECE)



Observation : 11 AA identifiés  
sur 18.

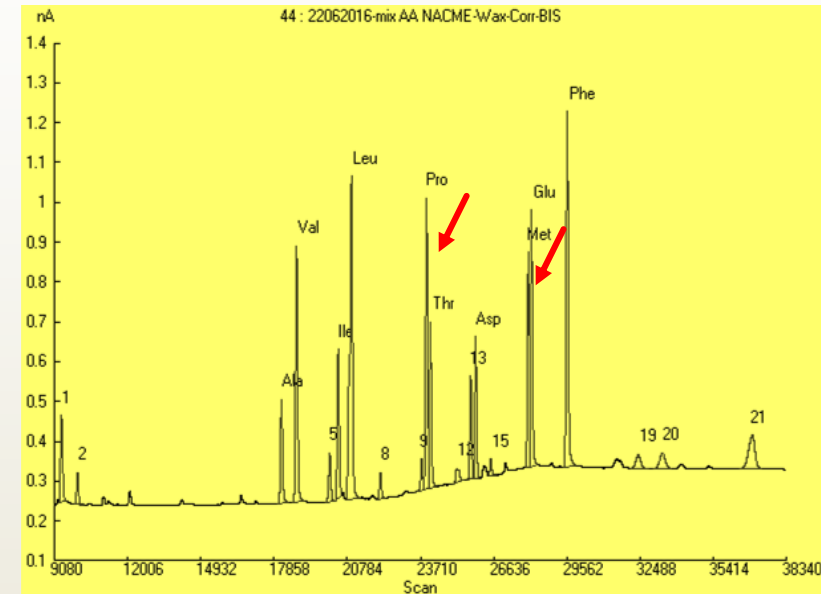


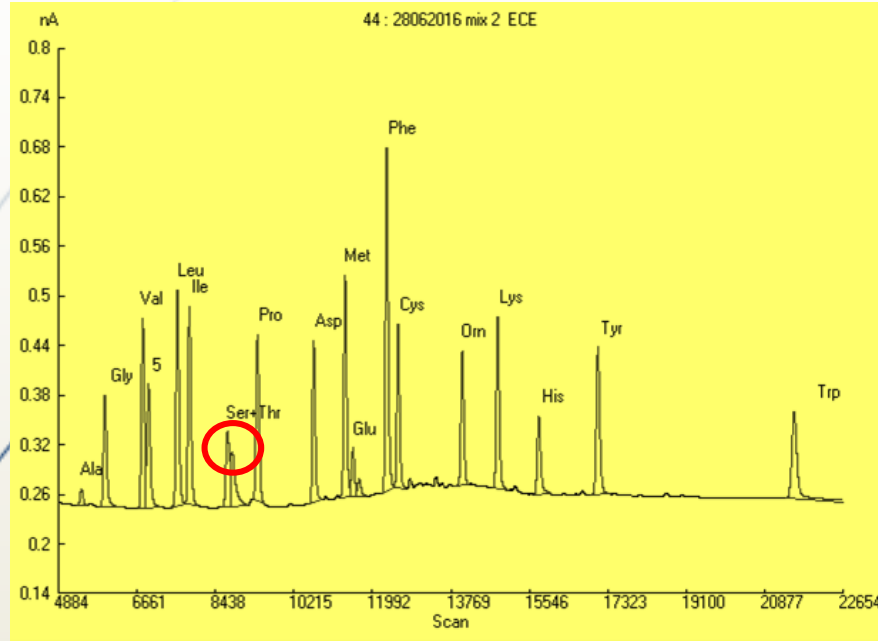
Figure 4 : Dérivation par acétylation NACME



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

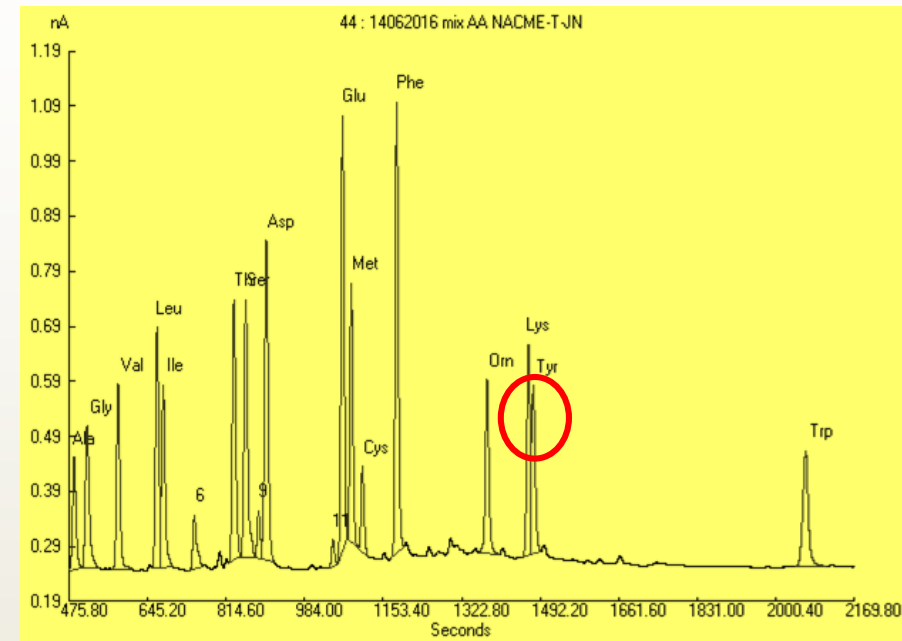
# Développement de méthodes par GC-C-IRMS

- 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



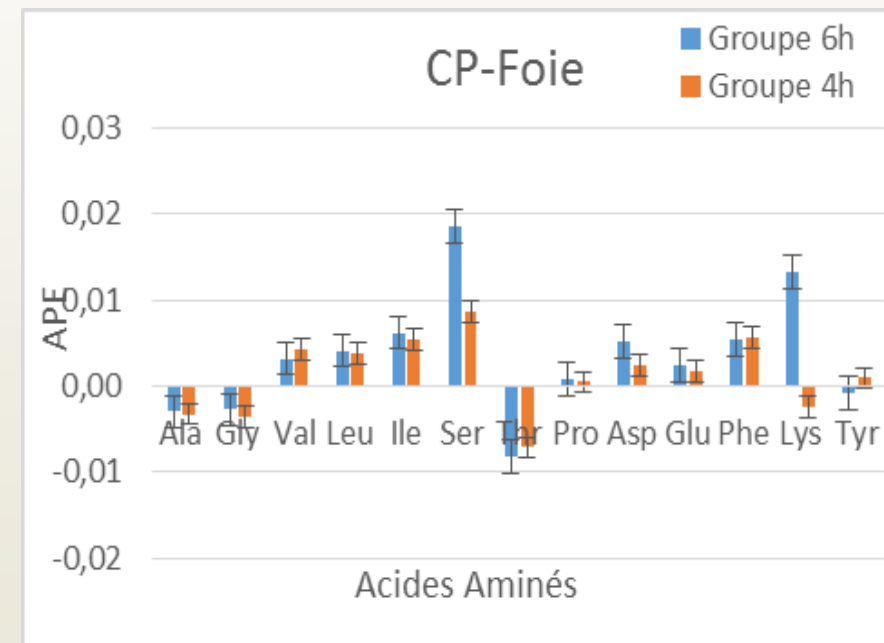
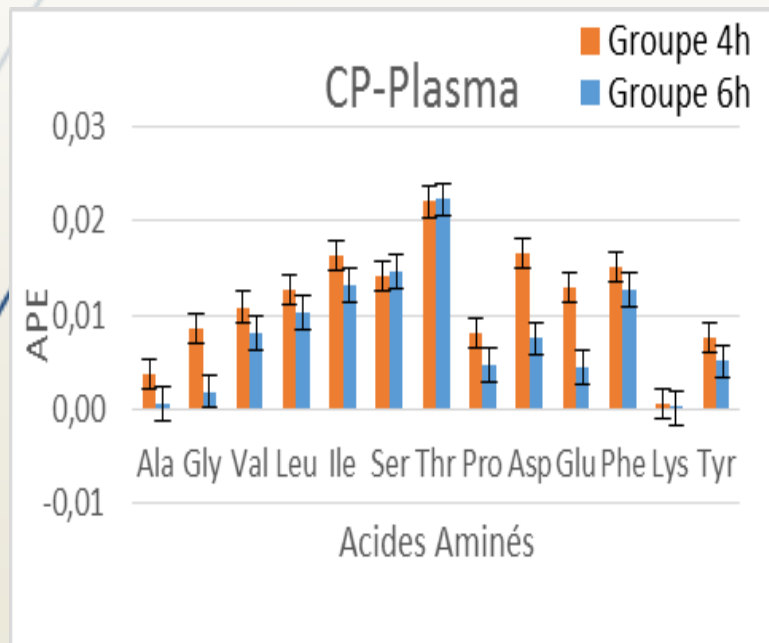
Observations :

- 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**

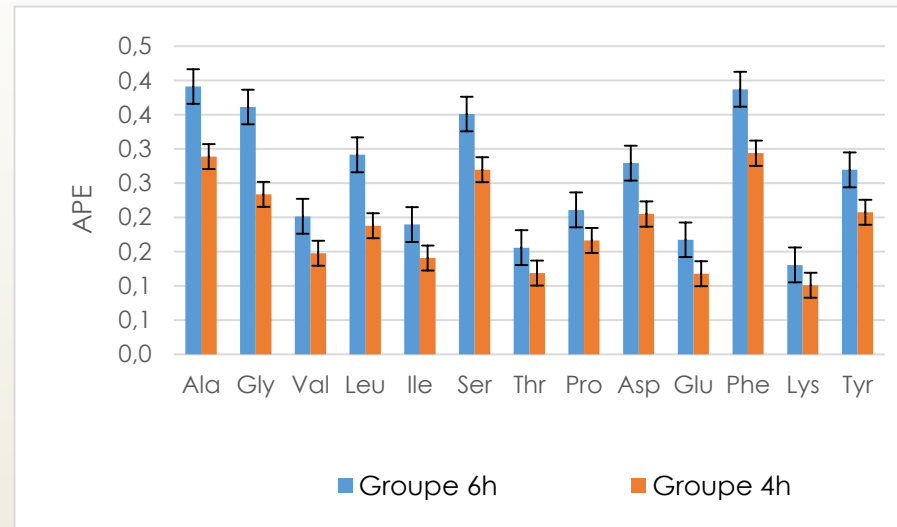
# Analyses des échantillons biologiques par GC-C-IRMS

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



# Développement de méthodes par GC-C-IRMS

- Enrichissements des AA individuels en mode  $^{13}\text{C}$  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 serait à la base des difficultés rencontrées lors de leur analyse



# Développement de méthodes par GC-C-IRMS

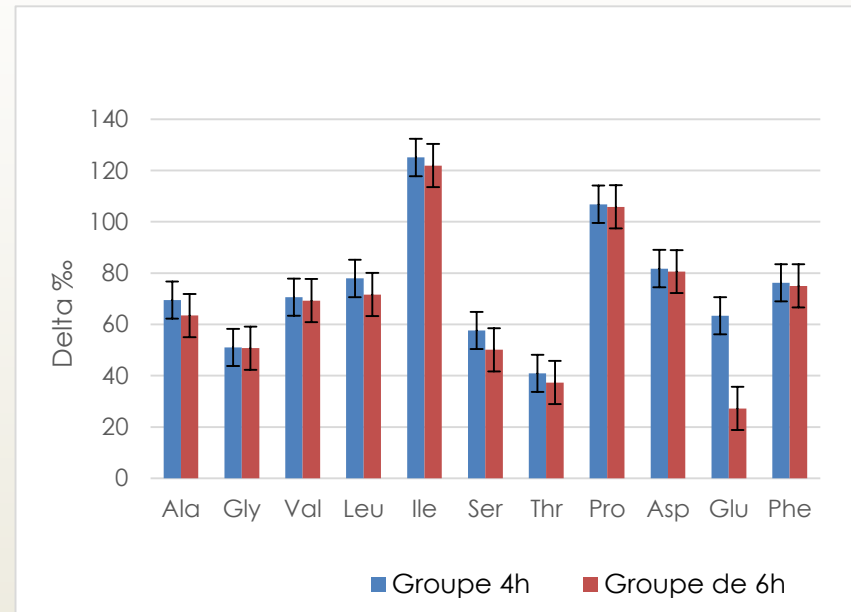
- Lien entre les deux groupes de rats pour chaque acide aminé.

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*
Thréonine	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  $^{15}\text{N}$  exprimés en Atom Percent Excess (APE)



**Figure : Enrichissement en  $^{15}\text{N}$  dans le plasma**

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

# Dosage de concentration par HPLC

## ➤ Chromatogramme et concentrations des différents AA

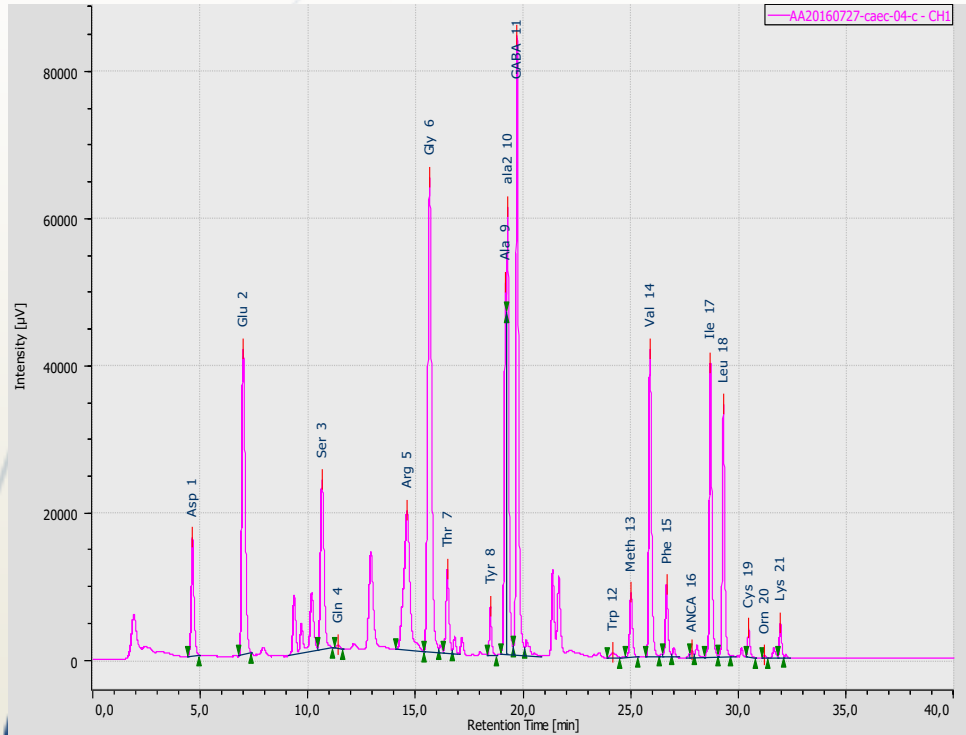


Figure : Chromatogramme d'un échantillon de caecum

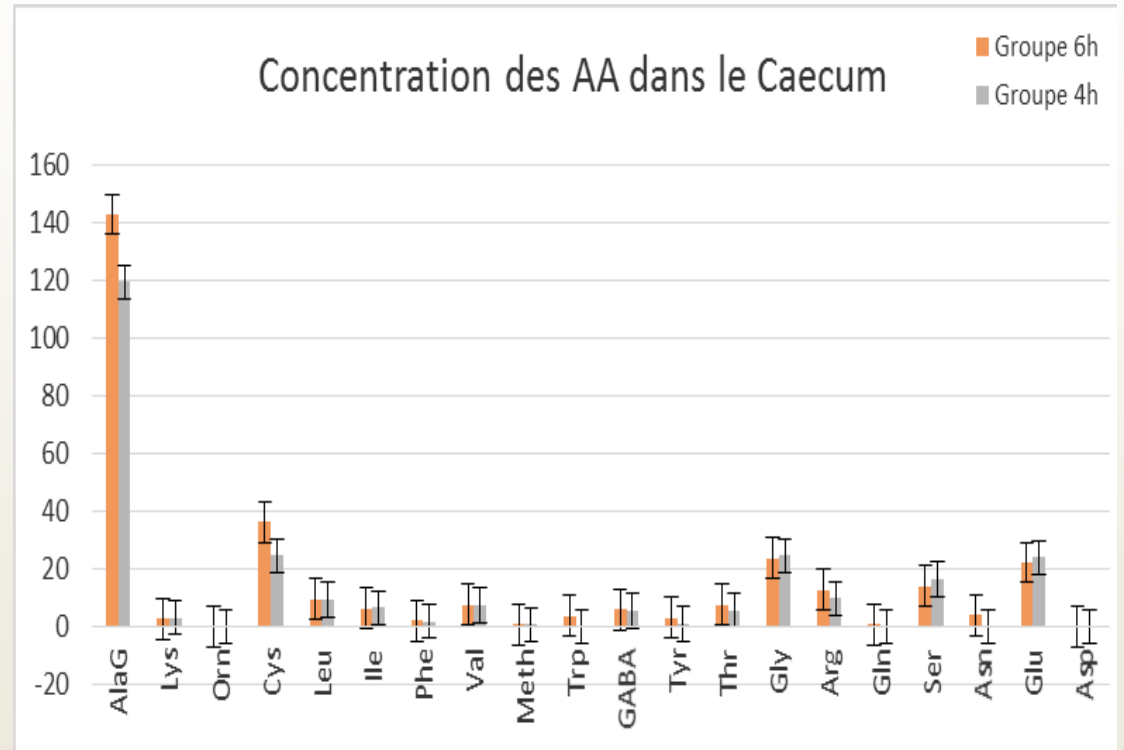


Figure : Concentration des différents AA dans le caecum

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



# 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 dérivatisation
- 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***