

**Productions Végétales et Industries
Agroalimentaires (PVIA)**
Université de Picardie Jules Verne

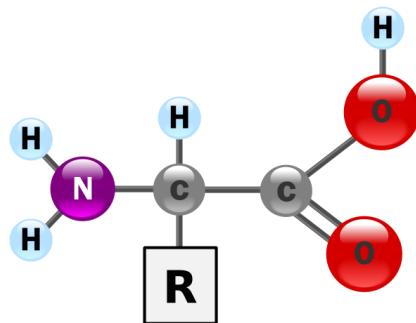
NOM : AKISSOE

Prénom : Lorène

Année 2015-2016

Mémoire de stage de Master 1

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



Stage encadré par : Claire GAUDICHON
Tuteur universitaire : Manuella CATTEROU
Nom de l'entreprise : AgroParisTech-PNCA
Son adresse : 16 Rue Claude Barnard

Table des matières

Table des matières	i
Liste des abréviations	ii
Liste des figures	ii
Liste des tableaux	ii
Remerciements.....	1
Introduction.....	2
I. Présentation du sujet et de son intérêt pour le laboratoire PNCA.....	2
II. Présentation de laboratoire.....	3
III. Etude de la biodisponibilité des protéines du lait de chèvre chez le rat	4
A. Matériel et méthodes.....	4
1. Conception du repas et alimentation des rats	4
2. Quantification du pourcentage d'azote et de carbone et mesure de l'enrichissement global en ¹⁵ N et en ¹³ C par EA-IRMS	4
2.1. Principe de EA-IRMS	4
2.2. Calcul de la digestibilité des protéines du lait et des protéines de spiruline	5
3. Développement de méthodes analytiques pour mesure de l'enrichissement des acides aminés individuels par GC-C-IRMS.....	6
3.1. Principe de la méthode.....	6
3.2. Les techniques de dérivatisations étudiées.....	6
3.2.1. Dérivatisation Ethyle Chloroformate (ECE) et Méthyl Chloroformate (MCE)	6
3.2.2. Dérivatisations «N-Acétyle Propyle» (NAP) et «N-Acétyle méthyl»(NACME)	7
3.3. Les colonnes testées pour analyses par GC-C-IRMS	8
4. Analyse des échantillons biologiques par GC-C-IRMS	8
4.1. Précipitation des protéines contenus dans un tissu biologique	8
4.2. Hydrolyse des culots protéiques et des digestats (caecum)	8
4.3. Extraction des acides aminés sur résine échangeuse d'ions H ⁺	9
4.4. Dérivatisation des échantillons biologiques	9
5. Dosage de concentration des AA dans le Caecum par HPLC.....	9
6. Analyse statistiques	10
B. Résultats et Discussion	10
1. Proportion d'azote et de carbone exogène et calcul de la digestibilité des différentes protéines.....	10
2. Analyse par GC-C-IRMS: développement de méthodes	12
3. Analyse des échantillons biologiques par GC-C-IRMS	14
3.1. Détermination de l'enrichissement individuel en ¹³ C	14
3.2. Détermination de l'enrichissement en ¹⁵ N des acides aminés des culots protéiques du plasma.....	15
4. Dosage par HPLC.....	16
Conclusion	17
Perspectives.....	17
Références bibliographiques	18
Sites internet	18
Résumé	19
Abstract	19
Annexes	a

Liste des abréviations

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique
PNCA : Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire
INA-P/G : Institut national agronomique Paris-Grignon
Alim H : Alimentation Humaine
NACME : N-Acetyl methyl esters
NAP : N-Acétyle propyle esters
ECE : Ethyle Chloroformate Ester
GC-C-IRMS: Gas Chromatography- Combustion -Isotope Ratio Mass Spectrometry
EA-IRMS: Elemental Analysis - Isotope Ratio Mass Spectrometry
HPLC: High Performance Liquid Chromatography
PVIA: Production végétale et Industries Agroalimentaires
AA: Acide Aminé
ASS : Acide 5-Sulfosalicylique
CP : Culot Protéique
i.d : Diamètre interne

Liste des figures

Figure 1 : Réaction de la dérivation par éthyle chloroformate (Husék, 1998)	10
Figure 2 : Réaction de la dérivation par Méthyl chloroformate (Chen <i>et al.</i> , 2010)	10
Figure 4 : Schéma du dérivé NAP.....	11
Figure 5 : Schéma du dérivé NACME	11
Figure 6 : Etapes d'extraction sur résine	13
Figure 7 : (A) Azote exogène dans le tube digestif (B) Carbone exogène dans le tube digestif	15
Figure 8 : (A) Dérivatisation par alcool chloroformate sur colonne wax : cas de ECE (B) Dérivatisation par acétylation sur colonne wax : cas du NACME.....	17
Figure 9 : (A) Dérivatisation par alcool chloroformate sur RTX-17: cas de ECE (B) Dérivatisation par alcool chloroformate sur RTX-17 : cas du MCE (C) Dérivatisation par alcool chloroformate sur RTX-17 : cas du MCE(D) Dérivatisation par acétylation sur colonne	17
Figure 10 : Enrichissement en ^{13}C : (A) CP plasmatique (B) CP foie (C) Caecum	19
Figure 11 : Enrichissement des acides aminés individuels en mode azote.....	20
Figure 12 : Chromatogramme d'un échantillon de caecum	20
Figure 13 : Concentration des AA en mmol/L dans le Caecum.....	21

Liste des tableaux

Tableau 1 : Gradient utilisé pour lors de la séparation par HPLC Fluo	13
Tableau 2 : P-value entre les deux groupes de rats pour chaque AA	18

Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à l'endroit de Madame Claire GAUDICHON et Madame Nadezda KHODOROVA qui m'ont formée et accompagnée tout au long de cette expérience professionnelle avec beaucoup de patience et de pédagogie. Je remercie aussi Monsieur Laurent BROUDISCOU pour toute son implication lors des analyses en HPLC.

Je remercie l'ensemble du personnel du laboratoire de Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire (PNCA) pour les conseils qu'ils ont pu me prodiguer au cours de cette période de stage à AgroParisTech.

Je remercie également Madame Manuella CATTEROU, mon tuteur de stage, pour toute l'attention qu'elle m'a accordée dès la période de recherche de stage jusqu'à la rédaction du rapport.

Je remercie enfin tous les enseignants de la formation PVIA, ceux qui nous ont donné des cours tout au long de cette année académique.

Introduction

Les acides aminés sont importants pour les fonctions vitales car ils sont des composants de base des protéines qui servent également de sources d'énergies (Cui *et al.*, 2014). La valeur nutritionnelle des protéines dépend essentiellement de leur composition en acides aminés (González-Castro *et al.*, 1997). De nombreuses études ont été entreprises pour estimer la proportion et la nature des protéines exogènes d'origine alimentaire et des sécrétions azotées endogènes dans la lumière intestinale. La FAO recommande d'analyser la biodisponibilité de chaque AA indispensable pour caractériser la qualité des protéines. Ainsi, durant la période de mon stage, nous avons travaillé principalement sur les acides aminés (AA) individuelles. L'analyse des acides aminés individuels nécessite l'utilisation de différentes techniques, en particulier, les méthodes d'analyses de chromatographie en phase gazeuse. Dans l'optique d'acquérir de savoir-faire dans ce domaine, le choix de ce stage m'a donc paru évident.

Ce document présente les activités réalisées au sein du laboratoire et les résultats obtenus ainsi que les informations relatives à la création et au fonctionnement du laboratoire de Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire (PNCA).

I. Présentation du sujet et de son intérêt pour le laboratoire PNCA

La caractérisation de la qualité des protéines est une question préoccupante, car les nouvelles sources des protéines sont de plus en plus envisagées vu la croissance de la population mondiale. En raison de la présence de sécrétions endogènes dans la lumière intestinale, l'évaluation de la digestibilité des protéines alimentaires nécessite de distinguer les composés alimentaires des composés endogènes par des méthodes directes ou indirectes. Les méthodes utilisant le marquage des protéines ingérées ou des sécrétions endogènes, à l'aide d'un isotope stable de l'azote (^{15}N) ou du carbone (^{13}C), apparaissent comme les méthodes les plus précises pour déterminer la digestibilité des protéines ingérées (Otto *et al.*, 2003).

L'iléon est la dernière partie de l'intestin où les acides aminés (AA) sont absorbés. En conséquence, la mesure de la vraie digestibilité iléale des protéines et des acides aminés est la meilleure manière d'estimer leur apport nutritionnel (Garcia *et al.*, 2005). Par ailleurs, les mesures au niveau iléal impliquent de plus grandes contraintes techniques puisqu'elles nécessitent la mise en place de sondes au niveau de l'iléon terminal chez des sujets non iléostomisés (Mariotti *et al.*, 2000).

La Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) depuis 2007 recommande de caractériser la digestibilité des AA individuels et non seulement celle des protéines. Ainsi, une méthode analytique permettant de mesurer les enrichissements isotopiques dans ces

composés individuels est nécessaire, et de préférence, à partir de l'échantillon prélevé de façon moins invasive (par exemple, prélèvement sanguin) que la méthode de pose de sonde.

L'objectif du projet de recherche dans lequel s'inscrit mon stage est de vérifier si la méthode multi-traceurs pourraient permettre de mesurer la biodisponibilité des acides aminés individuels, notamment, en comparant les ratios $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ou $^{13}\text{C}/^2\text{H}$ des protéines ingérées et des acides aminés plasmatiques. Pour développer cette méthode, il faut comparer la digestibilité des protéines dans les prélèvements iléaux et également sanguins. Ainsi, une étude pilote chez le rat permettra d'obtenir les résultats sur la vraie digestibilité par la méthode « classique » et la nouvelle méthode.

Afin de tracer les protéines dans un repas, deux principales méthodes ont été développées. La première méthode est l'ajout de façon extrinsèque d'un acide aminé marqué au repas permettant de produire des métabolites endogènes marqués et la seconde méthode est l'utilisation des protéines dans lesquelles les acides aminés sont marqués de façon intrinsèque (Fromentin *et al.*, 2012).

Avec l'avancée des méthodes d'analyses, en particulier avec le développement de la chromatographie en phase gazeuse- combustion-spectrométrie de masse à rapport isotopique (GC-C-IRMS), il est désormais possible de faire la mesure des isotopes stables dans les composés individuels (Brenna *et al.*, 1997). Pour analyser les enrichissements isotopiques des acides aminés (AA) par GC-C-IRMS, de nombreuses étapes de préparation de l'échantillon doivent être réalisés, ce qui présente des fois un défis analytique. Notamment, dans le cas du dosage en mode azote, un problème de fractionnement isotopique dû au protocole utilisé est souvent rencontré (échange sur résine H^+). Pour le dosage des enrichissements isotopiques en ^{13}C , il est nécessaire d'appliquer la correction prenant compte du nombre d'atomes de carbone ajoutés lors de la dérivatisation (Middelburg *et al.*, 2000). Ainsi, le choix de la procédure de dérivatisation se pose, car les différentes méthodes de dérivatisations présentent une variabilité entre la stabilité des dérivés formés, le rendement, la résolution chromatographique et les erreurs analytiques (Corr *et al.*, 2007).

Les objectifs de ce stage ont été de (1) : Développer une méthode analytique permettant de mesurer les enrichissements des isotopes ^{13}C et ^{15}N dans les AA par GC-C- IRMS et (2) : Etudier la biodisponibilité des AA individuels des protéines du lait de chèvre et de la spiruline chez le rat.

II. Présentation de laboratoire

L'UMR 914 encore connu sous le nom de « Laboratoire de Physiologie de la nutrition et du Comportement Alimentaire », a été créé en 2002 à l'issue du regroupement d'une unité de

l'INRA et des enseignants-chercheurs de la Nutrition Humaine de l'INA-P/G (AgroParisTech depuis 2005). Elle est rattachée au sein d'AgroParisTech, au département « Sciences de la Vie et Santé » et au sein de l'INRA, au département « Alim-H ». Elle fait également partie de l'Université Paris Saclay. L'Unité est organisée en trois équipes qui participent à la progression des thématiques de recherche.

- **Equipe 1** : est chargée de l'étude de l'Apport protéique et adaptations intestinales.
- **Equipe 2** : s'occupe de l'étude du Métabolisme protéique, homéostasie énergétique et du comportement alimentaire. **Mon stage s'est déroulé au sein cette équipe.**
- **Equipe 3** : est chargée de l'étude des Protéines, du métabolisme des acides aminés et prévention du syndrome métabolique.

Le but des recherches du laboratoire de Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire (PNCA) est de contribuer à l'analyse de l'efficacité nutritionnelle des protéines et de l'apport énergétique dans différentes situations physiologiques ou physiopathologiques. (Site internet 1).

III. Etude de la biodisponibilité des protéines du lait de chèvre chez le rat

A. Matériel et méthodes

1. Conception du repas et alimentation des rats

Les rats ont consommé un repas marqué à différents traceurs : ^{15}N et ^{13}C . L'aliment contenant le marquage en ^{15}N était les protéines du lait de chèvre : le marquage en ^{15}N peut être obtenu par l'administration orale de ^{15}N inorganique, sous la forme de sulfate d'ammonium. Etant donné qu'il est difficile de marquer le lait en ^{13}C , on a utilisé de la spiruline qui est un micro algue dans le repas, ce qui permet la production des métabolites pour le dosage en ^{13}C .

12 rats ont été utilisés pour cette étude. Les rats ont consommé le repas-test et l'abattage a été fait 4 h après ($n=6$) et 6 h après ($n=6$). Le plasma, le foie et les digestats de chaque rat ont été prélevés.

Il faut noter que tous ces travaux ont réalisés avant le début de mon stage.

2. Quantification du pourcentage d'azote et de carbone et mesure de l'enrichissement global en ^{15}N et en ^{13}C par EA-IRMS

2.1. Principe de EA-IRMS

L'analyseur élémentaire (EA ; Vario Micro, Elementar, Lyon) permet de mesurer le pourcentage total en ^{15}N et/ou en ^{13}C dans un échantillon donné.

Les échantillons préalablement lyophilisés sont enveloppés dans des capsules et injectés par un système automatique. Ils sont ensuite brûlés en présence d'oxygène. La réaction de combustion se passe dans un tube contenant du cuivre oxydé et maintenu à 950 °C.

Les gaz formés au cours de cette combustion sont des oxydes d'azote (NO, NO₂, NO₃), du dioxyde de carbone (CO₂), de l'oxygène (O₂) ainsi que de l'eau (H₂O), les autres composés (halogénés et soufrés) restent fixés dans le bas du tube de combustion. Les oxydes d'azote sont réduits en diazote (N₂) dans un four de réduction contenant du cuivre chauffé à 650°C et qui retient l'excès d'O₂ (sous forme de CuO₂). L'eau est aussi captée par des pièges. Pour les dosages en azote uniquement, le CO₂ aussi est également piégé. Le calcul du pourcentage se fait par rapport à un standard externe (atropine).

L'analyseur élémentaire est également couplé à un spectromètre de masse à ratio isotopique (IRMS, Isoprime, GV Instruments, Manchester) pour mesurer les enrichissements en ¹⁵N et ¹³C dans les échantillons. En effet, le gaz produit par combustion est acheminé dans la spectrométrie de masse à ratio isotopique où il est ionisé par impact électronique (M + e⁻ → M⁺ + 2e⁻) afin de produire des ions isotopomères ¹⁴N et ¹⁵N pour le dosage en mode azote et des ions isotopomères ¹²C et ¹³C pour le dosage en mode carbone. Ces derniers sont séparés par un champ magnétique avant d'être détectés au niveau du collecteur. Le calcul de l'enrichissement est réalisé à partir d'un gaz de référence, injecté au début et à la fin de chaque analyse et ensuite corrigé en utilisant un standard isotopique: l'acide glutamique. L'enrichissement se calcule par la formule suivante :

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

Où **Re** = rapport isotopique de l'échantillon isotope lourd/isotope léger ; **Rstd** = rapport isotopique du standard.

L'enrichissement peut également être exprimé sous d'Atome Percent (AP) ou Atome Percent Excess (APE ; c'est l'excès d'enrichissement d'un échantillon par rapport à une valeur basale). Nos résultats sont exprimés en APE pour certains et en delta per mille pour d'autres.

2.2. Calcul de la digestibilité des protéines du lait et des protéines de spiruline

Les digestibilités dans les protéines du lait et de la spiruline ont été déterminées respectivement à partir de la mesure de la quantité de l'azote alimentaire (¹⁵N) et du carbone (¹³C) non-absorbés. La mesure de la digestibilité permet de quantifier les protéines qui sont absorbées sous forme d'acides aminés par la muqueuse intestinale.

Elle est calculée par la formule suivante :

$$D (\%) = [(Q_N \text{ ou } C \text{ ingéré} - Q_N \text{ ou } C \text{ exogène}) / Q_N \text{ ou } C \text{ ingéré}] \times 100$$

$$Q_N \text{ ou } C \text{ ingéré} = Q_N \text{ ou } C \text{ repas} - Q_N \text{ ou } C \text{ exogène estomac + intestin + colon}$$

Où **Q_N ou C ingéré** : quantité d'azote ou de carbone ingérée dans le repas (mmol)
 Q_N ou C exogène : quantité d'azote exogène ou de carbone exogène dans l'intestin grêle, le caecum et le colon.

3. Développement de méthodes analytiques pour mesure de l'enrichissement des acides aminés individuels par GC-C-IRMS

3.1. Principe de la méthode

Le couplage de la chromatographie gazeuse et de la spectrométrie de masse (GC-C-IRMS ; annexe 1] permet de mesurer la composition isotopique moléculaire des différents composés d'un mélange. Après avoir été séparé par chromatographie en phase gazeuse, chaque composé est converti en dioxyde de carbone, en oxyde d'azote et en eau dans un four de combustion constitué d'un tube en quartz rempli d'oxyde de cuivre porté à 850°C. L'eau est éliminée par une membrane nafion qui utilise l'effet du contre flux à travers une paroi semi-perméable. L'ionisation des différents composés produits se fait comme au niveau d'EA-IRMS.

La réduction des oxydes d'azote en N₂ s'effectue dans un four de combustion réglé à 930°C toujours en présence du cuivre oxydé. De plus, les traces d'eau sont piégées par un piège avec de l'azote liquide pour le mode azote.

3.2. Les techniques de dérivatisations étudiées

Les acides aminés étant non volatiles, il est impératif de faire une préalable dérivation qui permettra de les analyser en chromatographie en phase gazeuse. Nous avons testé deux types de dérivatisations sur 18 acides aminés standards (glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, thréonine, sérine, proline, méthionine, cystéine, aspartate, phénylalanine, glutamate, ornithine, lysine, histidine, tyrosine, arginine, tryptophane) avec pour but de choisir la dérivation qui permet d'observer une bonne séparation des acides aminés sur le chromatogramme avec la durée d'analyse le plus court.

3.2.1. Dérivation Ethyle Chloroformate (ECE) et Méthyl Chloroformate (MCE)

Les dérivatisations Ethyle Chloroformate (ECE ; figure 1) et Méthyl Chloroformate (MCE ; figure 2) se font suivant deux étapes : l'estérification de la fonction carboxylique avec de l'alcool et l'alkylation avec de l'alkyl chloroformate.

Pour la dérivation ECE, le protocole de Fromentin et co-auteurs (2012) a été utilisé. 1mg de chaque acide aminé (AA) standard, a été repris avec 4 ml d'eau MILLIQ. Ensuite, 3.2 ml d'une solution d'éthanol/pyridine (80/20, v/v) ont été ajoutés aux 4 ml de l'échantillon aqueux et le mélange a été agité au vortex avant l'addition de 400 µL d'éthyle chloroformate.

Chaque tube est laissé ouvert afin de permettre le dégagement du CO₂. La solution dans chaque tube a été agitée plusieurs fois jusqu'à l'absence de bulles.

Enfin, 400 µL de chloroforme avec 1% d'éthyle chloroformate (v/v) ont été ajoutés dans chaque tube et la solution a été vigoureusement agitée au vortex. La phase organique obtenue dans chaque tube a été récupérée dans des vials pour l'analyse des enrichissements par GC-C-IRMS. La dérivatisation MCE a été faite de la même manière. La différence entre les deux se situe au niveau des substances chimiques utilisées. Pour MCE, on a utilisé du méthanol/pyridine au lieu d'éthanol/pyridine pour ECE et du méthyl chloroformate à la place d'éthyle chloroformate.

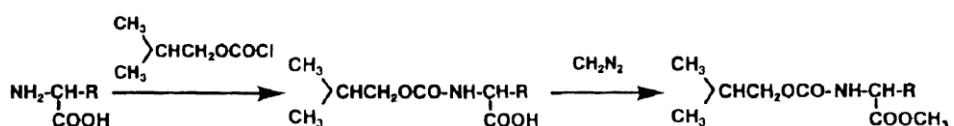


Figure 1 : Réaction de la dérivation par éthyle chloroformate (Husék, 1998)

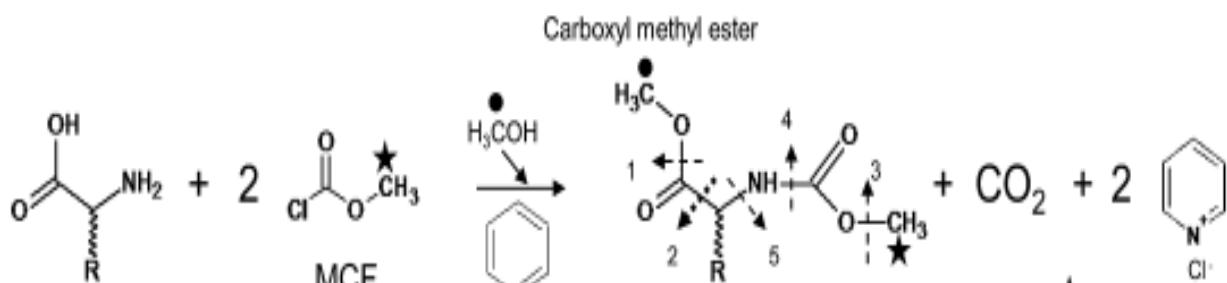


Figure 2 : Réaction de la dérivation par Méthyl chloroformate (Chen et al., 2010)

3.2.2. Dérivatisations «N-Acétyle Propyle» (NAP) et «N-Acétyle méthyl»(NACME)

Ces deux types de dérivation reposent sur deux principales étapes : l'estérification et l'acétylation.

L'estérification de la fonction acide carboxylique de 1 mg de chaque acide aminé standard a été faite avec 1mL de propanol HCl en proportion (5 / 1 ; v/v : **annexe 2**) pour la dérivation NAP et du méthanol HCl pour le NACME. Les échantillons sont ensuite mis dans le four à sec à 110°C pendant 20 min, puis refroidis dans un bain de glace. Après refroidissement, le réactif dans chaque tube a été évaporé à 60°C sous flux d'azote à 1 bar, jusqu'à qu'à l'absence de trace liquide.

L'acétylation de la fonction amine a été effectuée avec un réactif composé d'acétone, de triéthylamine et d'anhydre acétique (5/2/1 ; v/v ; **annexe 2**). Ce réactif d'acétylation s'utilise pour les deux différentes dérivatisations.

Les échantillons séchés lors de l'étape d'estérification sont repris avec 1ml de ce réactif puis placés au four à sec à 60°C pendant 4 min. Après refroidissement dans un bain de glace, ils sont ensuite séchés entièrement à 60°C sous flux d'azote, à 0,5 bar. Les dérivés sont enfin repris dans 50 µL d'éthyle acétate et l'homogénat obtenu dans le tube a été transféré dans un vial

pour être dosé en GC-C-IRMS. Les figures 3 et 4 montrent respectivement les dérivés NAP et NACME.

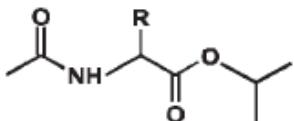


Figure 3 : Schéma du dérivé NAP

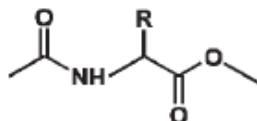


Figure 4 : Schéma du dérivé NACME

3.3. Les colonnes testées pour analyses par GC-C-IRMS

Nous avons testé les différentes dérivatisations sur 2 types de colonnes. Il s'agit de : la colonne RTX-17 (moyennement polaire ; Restek) et la colonne RTX-Wax (polaire ; Restek) de 30 m, i.d. 0.25 mm, épaisseur de phase 0.25 µm. Pour chaque colonne, nous avons appliqué différents programmes de four.

Pour la colonne RTX-17 le programme de four appliqué est : 150°C pendant 1min ; montée de température à 200°C (avec 4°C.min⁻¹) ; 200°C pendant 1min ; montée de température à 270°C (avec 25°C.min⁻¹) ; 270°C pendant 20 min (Fromentin *et al.*, 2012).

Quant à la colonne Wax nous avons appliqué le programme de température ci-après : 150°C pendant 1min ; montée de température à 200°C (avec 4°C. min⁻¹) ; 200°C pendant 1min ; montée de température à 250°C (avec 15°C. min⁻¹) ; 250°C pendant 40min.

4. Analyse des échantillons biologiques par GC-C-IRMS

Avant d'appliquer la dérivation sur les échantillons biologiques, d'autres manipulations préliminaires sont nécessaires à réaliser. Il s'agit de : la précipitation des protéines d'un tissu, l'hydrolyse et l'extraction des acides aminés sur résine H⁺.

4.1. Précipitation des protéines contenus dans un tissu biologique

La précipitation a été réalisée sur les plasmas et les foies des différents rats. Après broyage de l'échantillon avec de l'azote liquide dans un mortier, les protéines ont été précipitées par ajout de 1500 µL d'acide 5-sulfosalicylique (ASS) à 10%. Les échantillons ont ensuite été agités au vortex puis centrifugés à 3500 rpm, à 4°C, pendant 15 min.

Le surnageant de chaque échantillon contenant les acides aminés libres a été récupérés et conservés à - 20°C.

Les culots protéiques ont été rincés avec 400 µl d'ASS 10%, agités puis centrifugés (3500 rpm, 4°C, 15 mn). Cette étape a été répétée 3 fois afin de rincer le culot des acides aminés libres restants. Enfin, les culots ont été lyophilisés.

4.2. Hydrolyse des culots protéiques et des digestats (caecum)

Pour réaliser l'hydrolyse des culots protéiques du foie et du plasma de chaque rat obtenu lors de l'étape de précipitation des protéines, nous avons pesé 8-10mg de l'échantillon lyophilisé

pour le dosage en ^{13}C et environ 100mg pour le dosage en ^{15}N car le nombre de atomes d'azote dans une molécule d'acide aminé varie entre 1-2 contrairement au carbone (3-11 atomes). Pour avoir un signal similaire au carbone il est nécessaire d'avoir l'échantillon environ 10 fois plus concentré. L'hydrolyse a été faite également sur environ 10mg des échantillons de digestats (caecum).

Nous avons ensuite ajouté 2 mL d'HCl 6M pour le dosage en ^{13}C et 8 mL pour le ^{15}N . Les tubes sont ensuite placés sous le flux N₂ pendant 1 min pour prévenir l'oxydation puis chauffés à 110°C pendant 48h. Les hydrolysats ont été filtrés à l'aide des filtre de maille 0.2μm.

4.3. Extraction des acides aminés sur résine échangeuse d'ions H⁺

L'extraction a été réalisée sur les acides aminés libres et les hydrolysats. Elle a été faite sur une résine échangeuse de cations (Dowex AG50X8, Biorad, sous forme H⁺) selon la réaction suivante :



La figure 5 resume les étapes d'extraction des acides aminés sur résine H⁺.

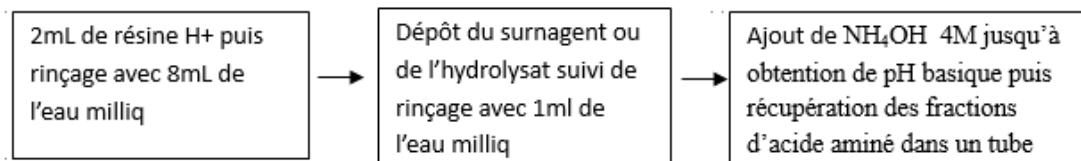


Figure 5 : Etapes d'extraction sur résine H⁺

Après l'extraction sur résine, les échantillons sont séchés au speed-vac.

4.4. Dérivatisation des échantillons biologiques

La dérivatisation appliquée à nos échantillons biologiques est la ECE. Avant d'être dérivé, les hydrolysats ont été séchés au speed-vac. Nous avons utilisé le protocole appliqué aux AA standards. Mais la phase organique a été concentrée sous flux d'azote à 21°C afin d'obtenir un bon rendement car il y avait une dilution de la concentration des échantillons due au grand volume de réactifs utilisés.

5. Dosage de concentration des AA dans le Caecum par HPLC

Nous avons également réalisé des analyses de chromatographie en phase liquide (HPLC).

L'appareillage HPLC utilisé est de marque Jasco (Japon) et est composé : (1) d'une pompe quaternaire, permettant de mélanger jusqu'à 4 liquides pour composer la phase mobile et en faire varier la composition au cours de l'analyse dans le cas d'une élution par gradient ;(2) d'un passeur automatique de 100 places, permettant une réaction de dérivation pré-colonne de

l'échantillon (Jasco AS1550) ; (3) d'un four à colonne réglé à 40°C et (4) d'un fluorimètre (Jasco FP2020plus).

Les acides aminés ne possédant pas de chromophores pour être détectés en fluorescent, il est nécessaire de faire une dérivation.

La dérivation pré-colonne a été réalisée automatiquement par mélange de 10µL de l'échantillon et de 10µL du réactif O-phtaldehyde (OPA) dans la boucle d'injection, suivie d'un délai de 2 minutes d'attente avant l'injection. La séparation chromatographique a été faite sur la colonne Symmetry C18 (Waters), longue de 150 mm, de diamètre 4,6 mm, remplie d'une phase apolaire de diamètre 3,5 µm permettant une séparation en phase inverse. La colonne est protégée des impuretés par une pré-colonne contenant la même phase et mesurant 5 mm. Nous avons utilisé le gradient présenté dans le tableau 1, selon le protocole de Noctor *et al.*, 2007.

Tableau 1 : Gradient utilisé pour lors de la séparation par HPLC Fluo

Temps (min)	0,01	1	6	11	16	20	32	36	37	42
%A	100	100	86	86	50	50	0	0	100	100
%B	0	0	14	14	50	50	100	100	0	0

L'annexe 3 décrit la composition des tampons A et B. Le débit d'élution est 0,8 ml / min. La détection se fait par un détecteur fluorescent avec $\lambda=340\text{nm}$ (émission) et 455nm (excitation). L'annexe 3 montre aussi la procédure de préparation de l'OPA (Noctor *et al.*, 2007). Nous avons hydrolysé environ 10mg de chaque échantillon avec 2mL de HCl 6M dans un four à sec à 110 °C pendant 48 h. Afin de déterminer le rendement à l'issue de l'hydrolyse, 10 µl de l'acide γ -aminobutyrique (GABA), choisi comme standard interne, concentration finale de 0.1 mM, a été ajouté à chaque échantillon avant l'hydrolyse. Les hydrolysats ont été filtrés et séché au speed vac, ensuite repris dans 99 µl de 0.1N HCl, centrifugé afin de se débarrasser des débris éventuels. La détermination des aires de pics de chaque acide aminé individuelle a été faite grâce à une gamme du mélange des standards contenant également le standard interne GABA.

6. Analyse statistiques

Les résultats de digestibilités des différentes sources de protéines sont présentés sous forme de moyenne \pm écart type. Nous avons utilisé le logiciel XLSTAT pour l'analyse de nos données sur les deux groupes de rats (Groupe de 6h et le Groupe de 4h). Nous avons appliqué le test t de Student.

B. Résultats et Discussion

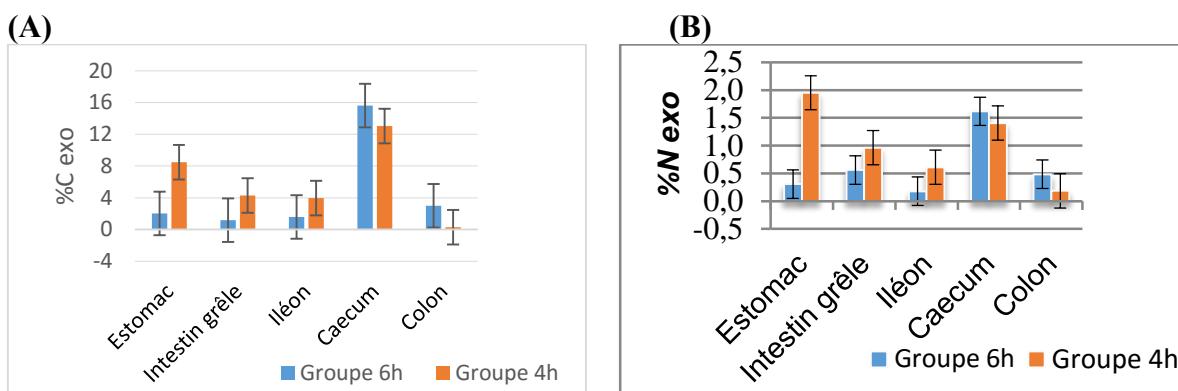
1. Proportion d'azote et de carbone exogène et calcul de la digestibilité des différentes protéines

➤ **Quantité d'azote exogène et calcul de la digestibilité des protéines du lait**

La figure 6-A montre les quantités d'azote dans les différents compartiments du tube digestif. Ces différentes valeurs ont permis de calculer la digestibilité des protéines du lait chez les deux groupes de rats. La digestibilité des protéines du lait dans le groupe de 6h est de $97,86 \pm 0,40\%$ et dans le groupe de 4h est de $97,89 \pm 0,29$; P-value=0,89 ($p>0.05$). Ces résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes de rats.

➤ **Quantité de carbone exogène et calcul de la digestibilité des protéines de la spiruline**

La figure 6-B présente le pourcentage de carbone exogène dans les différents organes ayant servi au calcul de digestibilité. La digestibilité des protéines de la spiruline dans le groupe de 6h est de $79,16 \pm 6,44\%$ et dans le groupe de 4h elle est de $83,51 \pm 2,856$; P-value =0,205 ($p>0.05$). Par conséquent, il n'y pas de différence entre les deux groupes de rats.



Nous avons cherché à connaitre également si les deux sources de protéines c'est-à-dire le lait et la spiruline présentent des digestibilités proches. Pour les protéines de la spiruline la moyenne de la digestibilité avec les deux groupes de rats confondus est de $81,28 \pm 4,82\%$ et pour les protéines du lait la moyenne est de $97,82 \pm 0,33\%$; P-value < 0,0001 ($P<0.05$). Ces résultats permettent de conclure qu'il existe une différence significative entre les deux sources de protéines. La digestibilité des protéines du lait est supérieure à celle de la spiruline. Gaudichon *et al.* 1999, ont montré que la digestibilité iléale réelle des protéines purifiées du lait vache était de 95%. Rutherford *et al.*, 2006, ont montré que la digestibilité iléale vraie des protéines de lait de chèvre était similaire à celles issues du lait de vache. Ainsi on peut conclure que la digestibilité des protéines du lait de chèvre que nous avons obtenue dans notre étude se rapproche de cette valeur. Quant aux protéines végétales, leur digestibilité est généralement plus basse par rapport aux protéines du lait (par exemple, entre 91-92% pour le soja ; Mariotti *et al.*, 2000, 90% pour le pois; Mariotti *et al.*, 2001 ; ou 84% pour le colza ; Bos *et al.*, 2007).

Ainsi, les protéines de la spiruline utilisées pour notre étude présentent une digestibilité plus basse que celle des autres protéines végétales étudiées précédemment.

2. Analyse par GC-C-IRMS: développement de méthodes

Dans notre étude, les méthodes de dérivatisations testées nous ont permis d'observer différents types de chromatogrammes sur les deux colonnes utilisées.

➤ Colonne Rtx-Wax

En utilisant la colonne polaire Wax, la durée totale d'analyse par échantillon est de 62min dans les deux cas de dérivatisations testées. La figure 7-A montre un exemple de chromatogramme de la dérivatisation ECE. Pour les dérivatisations par alkyl chloroformate (ECE et MCE) on a pu identifier 11 acides aminés sur tous les 18 contenus dans le mix. Les acides aminés ayant un long temps de rétention n'ont pas pu être détectés : ornithine, cystéine, lysine, histidine, tyrosine et tryptophane.

Le chromatogramme des dérivés NACME analysés sur la colonne Wax est montré sur la **figure 7-B**. Pour les dérivés par acétylation (NACME et NAP), nous avons observé plusieurs co-élutions entre les acides aminés. Ornithine, cystéine, lysine, histidine, tyrosine et tryptophane n'ont pas été détectés et de plus les différentes co-élutions ont été observé: la Glutamate et la Méthionine ; La Thréonine et la Proline. Ces résultats ne sont pas cohérents avec ceux obtenus par Corr *et al.*, 2007, qui, en utilisant les dérivatisations NAP et NACME et la colonne Wax ont pu obtenir la séparation de 13 AA sur un mix de 15 AA analysés. Notamment, ils ont pu détecter la lysine et la tyrosine et ils n'ont pas observé la co-élution de la thréonine et de la proline.

➤ Colonne RTX-17

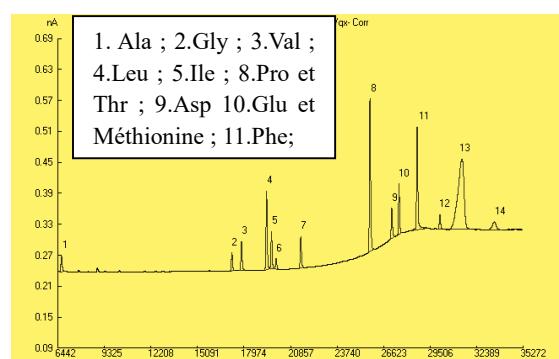
Les dérivatisations ECE et MCE sur la colonne RTX-17 nous montrent des chromatogrammes similaires (**figure 8-A et 8-B**). Nous avons pu identifier la totalité des 18 acides aminés injectés dans un intervalle de temps compris entre 9 à 25 min. La durée d'analyse par échantillon est 40 min. Nous avons observé une bonne séparation de 16 acides aminés et une co-élution partielle de la serine et de la thréonine.

En utilisant la colonne RTX-17 pour les dérivatisations par acétylation (NACME et NAP) nous avons observé une bonne séparation de 16 acides aminés en un intervalle de temps compris entre 7 à 35min et la co-élution totale de la lysine et de la tyrosine (**figure 8-C et 8-D**). La durée d'analyse par échantillon est 62 min.

Ainsi, les deux types de dérivatisations étudiées en utilisant la colonne Wax ne permettent pas d'obtenir des résultats exploitables car tous les composés n'ont pas pu être observés. En utilisant la colonne moins polaire Rtx-17, les deux types de dérivatisations nous

permettent de détecter 16 AA sur 18 analysés. Mais la co-élution totale observé entre la lysine et la tyrosine pour les dérivatisations par acétylation (NACME et NAP) représente un inconvénient dans le cadre de cette étude car la lysine et la tyrosine sont des acides aminés indispensables. La co-élution partielle de la serine et de la thréonine observé au niveau des dérivatisations par alkyl chloroformate est donc préférable dans ce cas parce étant donné que la serine n'est pas indispensable. De plus, la durée d'analyse plus courte pour les dérivés ECE par rapport à NACME est un point important, car ceci permet d'analyser un nombre élevé d'échantillons. Pour conclure, nous avons choisi la dérivation par alkyl chloroformate (ECE) pour analyser les échantillons biologiques.

A



B

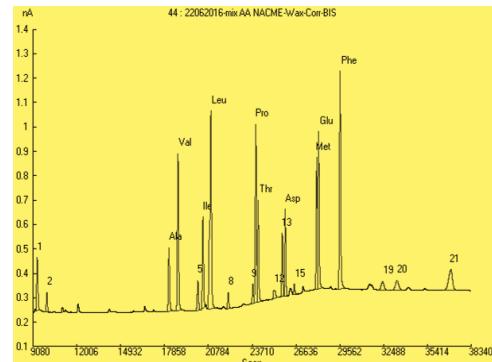
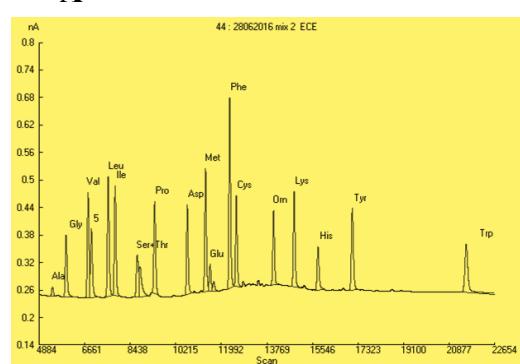
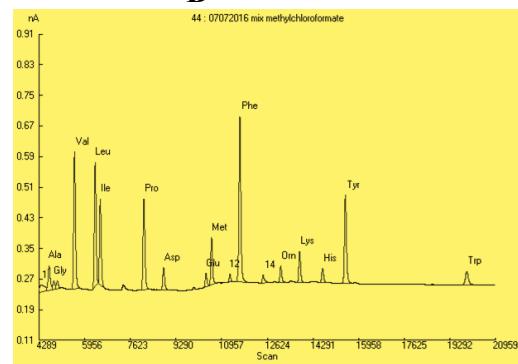


Figure 7 : Chromatogrammes ioniques du mélange des standards des AA obtenus en utilisant la colonne Rtx-Wax. (A) Dérivation par alcool chloroformate (ECE) (B) Dérivation par acétylation (NACME)

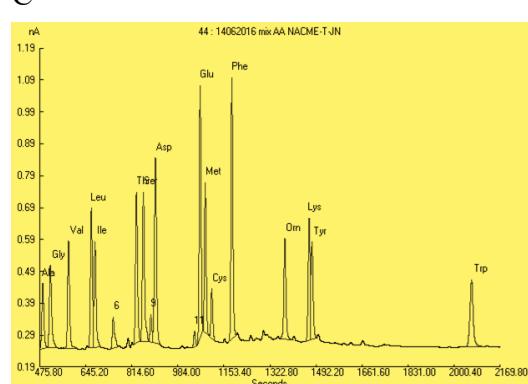
A



B



C



D

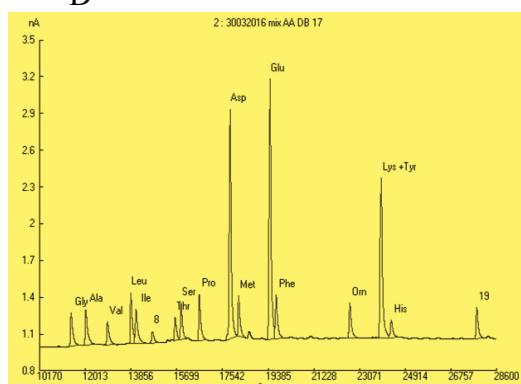


Figure 8 : Chromatogrammes ioniques du mélange des standards des AA obtenus en utilisant la colonne Rtx-17. (A) Dérivation par alcool chloroformate (ECE) ; (B) Dérivation par alcool chloroformate (MCE) ; (C) Dérivation par acétylation (NACME) ; (D) Dérivation par acétylation (NAP).

3. Analyse des échantillons biologiques par GC-C-IRMS

3.1. Détermination de l'enrichissement individuel en ^{13}C

Nous avons déterminé les enrichissements en ^{13}C dans les culots protéiques du plasma, du foie et dans les digestats (caecum). Les figures 9A ; 9-B et 9-C montrent l'atome percent excess (APE) des différents acides aminés dans les CP plasmatiques, du foie et dans les digestats, respectivement. Ces résultats montrent que l'enrichissement n'est pas uniforme entre les différents AA. Notamment, **dans le CP du foie**, l alanine et la glycine ne sont pas enrichis, la lysine est enrichie dans le groupe de 6h uniquement. La proline est enrichi très faiblement par rapport aux autres AA. La valine, la leucine, l aspartate montre le taux d'enrichissement similaire entre elles ainsi que l isoleucine et la phénylalanine. La serine présente un enrichissement le plus important. En somme, Les enrichissements dans les CP-Foie des acides aminés sont entre 0-0.02 APE. **Dans le CP du plasma**, la thréonine et la serine présentent un enrichissement élevé par rapport aux autres acides aminés quelques soit le groupe de rats. L alanine, la proline, la lysine et la tyrosine sont enrichis faiblement. La leucine et la valine sont enrichies moyennement. L isoleucine, la serine et la phénylalanine sont bien enrichis. Le glutamate, la glycine et l aspartate ont été enrichis pour le groupe de 6h mais moyennement dans celui de 4h. Pour les CP-Plasmatiques les enrichissements sont également entre 0-0.02 APE. **Dans le caecum** on a observé des enrichissements variant entre 0.1-0.4 APE. Ces valeurs sont supérieurs par rapport aux enrichissements observés dans les CP plasmatiques et du foie. En effet, Les AA enrichis représentent les AA des protéines non-digérées provenant du repas, ce qui explique leur enrichissement plus fort par rapport aux AA du CP plasma et foie, qui, à leur tour, proviennent de synthèse protéique. Ces résultats expliquent la faible digestibilité des protéines de la spiruline.

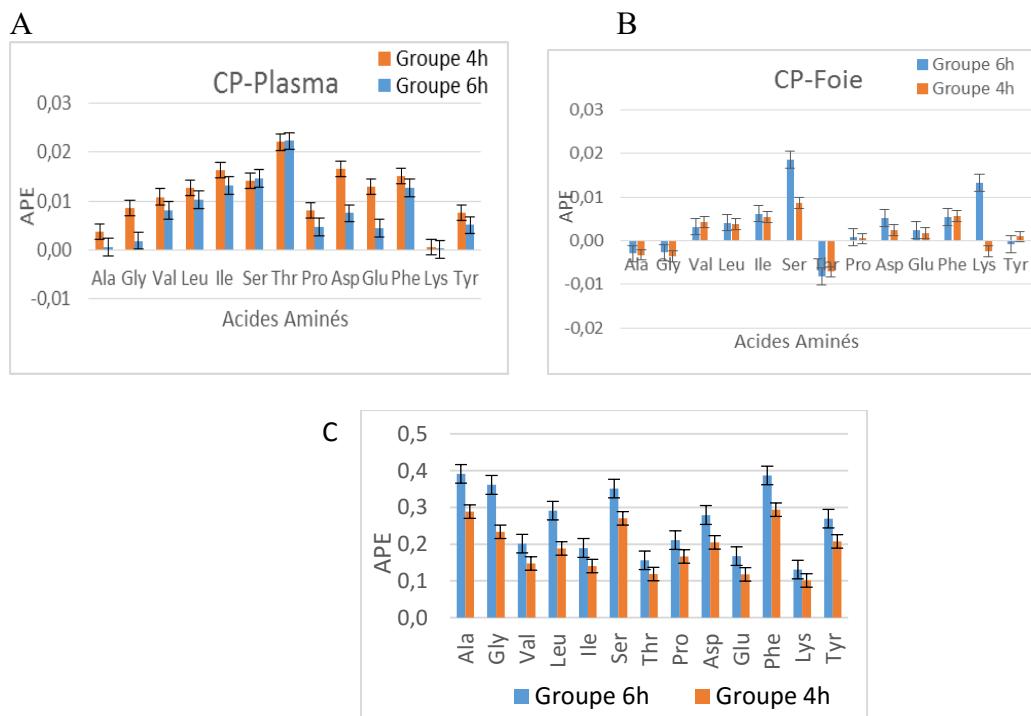


Figure 9 : Enrichissement en ^{13}C des AA individuels : (A) CP plasmique (B) CP foie (C) Caecum

Le tableau 2 montre le lien entre les deux groupes de rats pour chaque acide aminé.

Tableau 2 : P-value entre les deux groupes de rats pour chaque AA

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**

(* : Pas de différence ; ** : différence significative)

L'analyse des acides aminés libres plasmatiques n'a pas pu être réalisé car quelques soit le type de dérivatisations nous n'avons pas pu obtenir de signal. Il s'agirait probablement d'un problème de traitement pré-dérvatification.

3.2. Détermination de l'enrichissement en ^{15}N des acides aminés des culots protéiques du plasma

Pour déterminer l'enrichissement en ^{15}N dans les échantillons nous avons utilisé une colonne avec la phase stationnaire de 0.5 μm , afin d'augmenter les capacités résolutives de la colonne

lors de l'injection de l'échantillon très concentré. La figure 10 nous montre que l'enrichissement en ^{15}N des différents acides aminés dans les deux groupes de rats sont approximativement proches à l'exception de la Glutamate où l'enrichissement dans le groupe de 6h est faible par rapport à celui de 4h. Aussi, nous n'avons pas pu détecter la tyrosine et la lysine dans l'ensemble des échantillons analysés. De plus, le retour à la ligne de base entre certains AA adjacents n'était pas toujours achevé, ce qui n'a pas permis l'intégration de certains pics. Les enrichissements des différents acides aminés montrent que les culots protéiques du plasma sont bien enrichis dans les deux groupes de rats. Ces résultats sont cohérents avec ce que nous avons trouvé par EA-IRMS car les enrichissements obtenus démontrent que les protéines du lait présentent une meilleure digestibilité que les protéines de la spiruline. Bos *et al.*, 2003 ont montré que les enrichissements en ^{15}N des différents acides aminés du lait de vache dans le plasma variaient entre 0.1-0.25 APE et pour le soja se trouvaient entre 0.2-0.3APE.

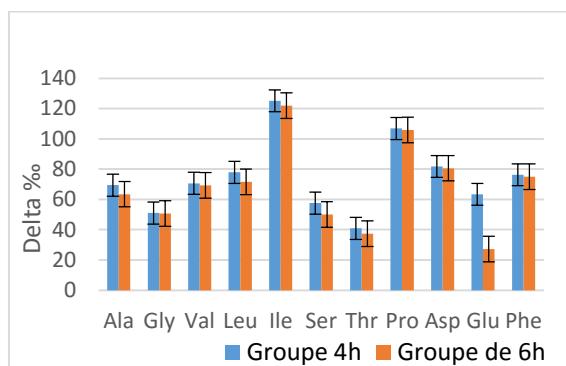


Figure 10 : Enrichissement en ^{15}N des acides aminés individuels du CP plasmatique

4. Dosage par HPLC

La concentration des différents acides aminés a été déterminée par l'utilisation de la gamme de dilution du mélange de standards. La figure 11-A montre le chromatogramme d'un échantillon de caecum. La figure 11-B montre que lalanine est le seul acide aminé ayant une concentration élevée. Pour certains AA, notamment, ornithine, méthionine et aspartate, l'air du pic détecté avait la valeur inférieure de « 0 » de la gamme. Ceci indique une possible variabilité du signal obtenu lors injection due à la variabilité du rendement de dérivation. Ainsi, l'utilisation d'un standard interne rajouté dans l'échantillon avant l'injection devrait être envisagée, afin de corriger cette erreur analytique. La leucine, l'isoleucine, la valine, le Gaba, la Thréonine ont des concentrations similaires. La lysine, la phénylalanine et le tryptophane et la tyrosine présentent des concentrations proches.

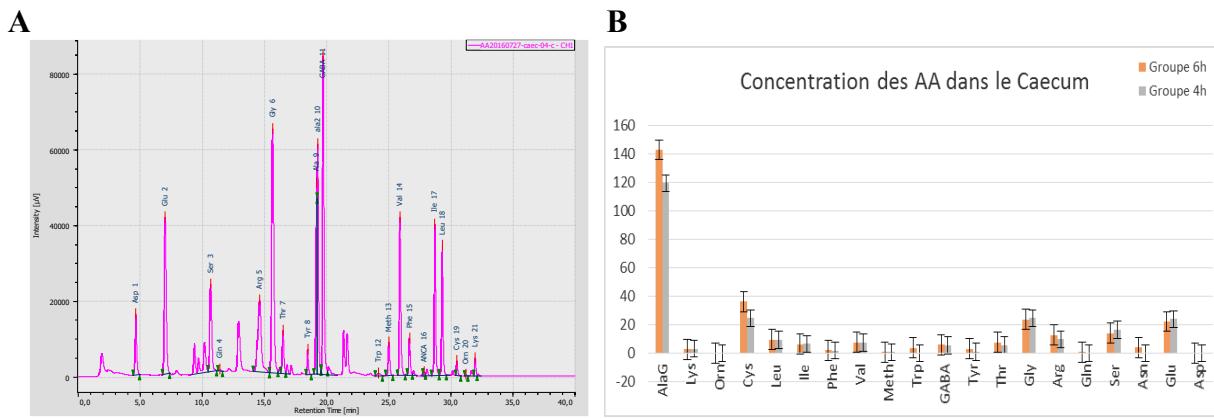


Figure 11 : (A) Chromatogramme d'un échantillon de caecum (B) Concentration des AA dans le caecum

Conclusion

Dans cette étude nous avons mis au point une méthode pour la mesure des enrichissements isotopiques en ^{13}C pour les acides aminés par GC-C-IRMS : la dérivation ECE et l'utilisation de la colonne moyennement polaire permettant de détecter 18 AA dont 2 co-éluent partiellement. Cette procédure de dérivation a été appliquée aux acides aminés issus de l'hydrolyse des protéines (foie, plasma, caecum), mais n'a pas permis d'analyser les acides aminés libres. Les résultats des enrichissements individuels déterminés sur GC-C-IRMS montrent que les acides aminés n'ont pas été enrichis de la même manière dans les différents organes. Lorsque nous avons passé les échantillons en mode azote, la séparation chromatographique observée était moins efficace car la ligne de base n'était pas bien définie, mais l'enrichissement mesuré pour les AA détectés était plus uniforme, que pour ^{13}C . Les concentrations des AA dans le caecum ont été déterminées par utilisation de la chromatographie en phase liquide. Ceci permettra dans la suite de l'étude de déterminer la digestibilité des différents acides aminés individuels.

Perspectives

➤ Développement de méthodes par GC-C-IRMS

Le protocole utilisé n'a pas permis de détecter les AA libres. Ainsi, il est envisagé de faire des études complémentaires afin d'établir la procédure permettant leur détection. Également, en mode azote les problèmes de performance chromatographiques ont été rencontrés, ce qui nécessite la mise au point de méthode pour ce mode d'analyse.

➤ Détermination de concentration pour l'analyse sur HPLC

Pour le dosage des concentrations des acides aminés il faudrait 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. Il serait également possible d'étudier la dynamique de la réaction de dérivation à l'OPA pour vérifier son efficacité.

Références bibliographiques

- Brenna, J.T., Corso, T.N., Tobias, H.J. et Caimi, R.J. (1997) High precision continuous-flow isotope ratio mass spectrometry. *Mass Spectrometry Review*, 16, 227-258.
- Bos, C., Airinei, G., Mariotti, F., Benamouzig, R., Bérot, S., Evrard, J., Fénart, E., Tomé, D., Gaudichon, C. (2007). The Poor Digestibility of Rapeseed Protein Is Balanced by Its Very High Metabolic Utilizationin Humans. *Journal of Nutrition*, 137, 595-600
- Bos C., Metges C. C., Gaudichon C., Petzke K. J., Pueyo M. E., Morens C., Everwand J., Benamouzig R., Tome D. (2003). Postprandial Kinetics of Dietary Amino Acids Are the Main Determinant of Their Metabolism after Soy or Milk Protein Ingestion in Humans. *Journal of Nutrition*, 133, 1308–1315
- Chen, W.P, Yang, X.Y., Hegeman, A.D., Gray, W.M., Cohen, J.D. (2010). Microscale analysis of amino acids using gas chromatography–mass spectrometry after methyl chloroformate derivatization. *Journal of Chromatography B*, 878, 2199–2208
- Corr, L.T., Berstan, R. et Evershed, P.R. (2007) Optimisation of derivatisation procedures for the determination of d13C values of amino acids by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Communication. Mass Spectrometry*, 21,3759–3771
- Cui, Y., Jiang, Z., Sun, J., Yu, J., Li, M., Li, M. et Guo, X. (2014). Enantiomeric purity determination of (L)-amino acids with pre-column derivatization and chiral stationary phase: Development and validation of the method. *Food Chemistry*, 158, 401–407.
- Fromentin, C., Sanders, P., Nau, F., Anton, M., Fromentin, G. et Tomé, D., Thibault, J.N., Gaudichon, C. (2012). A pilot study for the intrinsic labeling of egg proteins with 15N and 13C. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 26, 43–48.
- Garcia, A.I., De Blas, J.C. et Carabano, R. (2005). Comparison of different methods for nitrogen and amino acid evaluation in rabbit diets. *Animal Science*. 80, 169–178.
- Gonzalez-Castro, M., López-Hernández, J., Simal-Lozano, J. et Oruna-Concha, M. (1997). Determination of amino acids in green beans by derivatization withphenylisothiocyanate and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatographic Science*, 35, 181–185.
- Husék, P. (1998). Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents. *Journal of Chromatography B*, 717, 57–91
- Mariotti, F., Pueyo, M.E., Tomé, D., Bérot, S., Benamouzig, R., et Mahé, S. (2001). The influence of the albumin fraction on the bioavailability and postprandial utilization of pea protein given selectively to humans. *Journal of Nutrition*, 131,1706-13.
- Mariotti, F., Mahé, S., Luengo, C., Benamouzig, R., Tomé, D. (2000). Postprandial modulation of dietary and whole-body nitrogen utilization by carbohydrates in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 954-62.
- Middelburg, J.J., Barranguet, C., Boschker, H.T.S., Herman, P.M.J., Moens, T. and Heip, C.H.R. (2000).The fate of intertidal microphytobenthos carbon: An in situ 13C-labeling study. *Limnology. Oceanography*, 5, 1224-1234.
- Noctor, G., Bergot, G., Mauve, C., Thominet, D., Lelarge-Trouverie, C., Prioul, J.N. (2007). A comparative study of amino acid measurement i leaf extracts by gas chromatography-time and high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Metabolomics*, 3, 161-174
- Otto, E.R., Yokoyama, M., Ku, P.K., Ames, N.K. et Trottier, N.L. (2003). Nitrogen balance and ileal amino acid digestibility in growing pigs fed diets reduced in protein concentration. *Journal of Animal Science*, 81, 1743-1753.
- Rutherford, S. M. and Moughan, P. J. (2003). The rat as a model animal for the growing pig indetermining ileal amino acid digestibility in soya and milk proteins, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 87, 292–300.

Site internet

1. www.jouy.inra.fr/pnca, consulté le 23/06/2016

Résumé

Dans cette étude nous avons mis au point une méthode permettant la détermination de l'enrichissement en ^{13}C et en ^{15}N dans les AA individuels, en utilisant le GC-C-IRMS. Nous avons testé 4 types de dérivatisations (par acétylation et par alkyl chloroformate) et 2 colonnes (Wax et RTX-17) afin d'obtenir la meilleure séparation chromatographique. La dérivatisation par éthyle chloroformate a été choisie pour analyser les échantillons biologiques car, en utilisant la colonne RTX-17, elle nous permettait d'obtenir de séparation pour 18 AA en un temps réduit. En parallèle, dans le cadre d'une étude pilote réalisée chez le rat, en utilisant les techniques de EA-IRMS, nous avons étudié la digestibilité des protéines du lait de chèvre et de la spiruline. 12 rats ont ingéré un repas contenant les protéines du lait marquées à ^{15}N et de la spiruline marqué en ^{13}C . L'abattage a été fait 4h après l'ingestion de repas ($n=6$) et 6h après le repas ($n=6$). La digestibilité des protéines du lait dans les deux groupes de rats est de 97,82% et celle des protéines de la spiruline est de 81,28%. Les analyses statistiques qu'on a réalisé ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les deux groupes de rats quelque soit la source de protéines considérées ($p=0,89$ pour les protéines du lait et $p=0,205$ pour la spiruline). Cependant, on a observé de différence en matière de la digestibilité des différentes sources de protéines ($P\text{-value} < 0,0001$). Nous avons également mesuré les enrichissements en ^{13}C dans les AA individuels provenant des protéines du plasma, du foie et dans les digestats (caecum). Nous avons obtenus pour l'ensemble des acides aminés des enrichissements variant entre 0-0.02 Atom Percent Excess (APE) pour les culots protéiques du foie et du plasma et pour le caecum les enrichissements des acides aminés étaient entre 0.1-0.4APE. En mode ^{15}N les enrichissements étaient compris entre 0.2-0.3 APE. Les concentrations des AA dans les contenus de caecum ont été déterminées par HPLC, ce qui permettra de calculer la digestibilité des AA individuels.

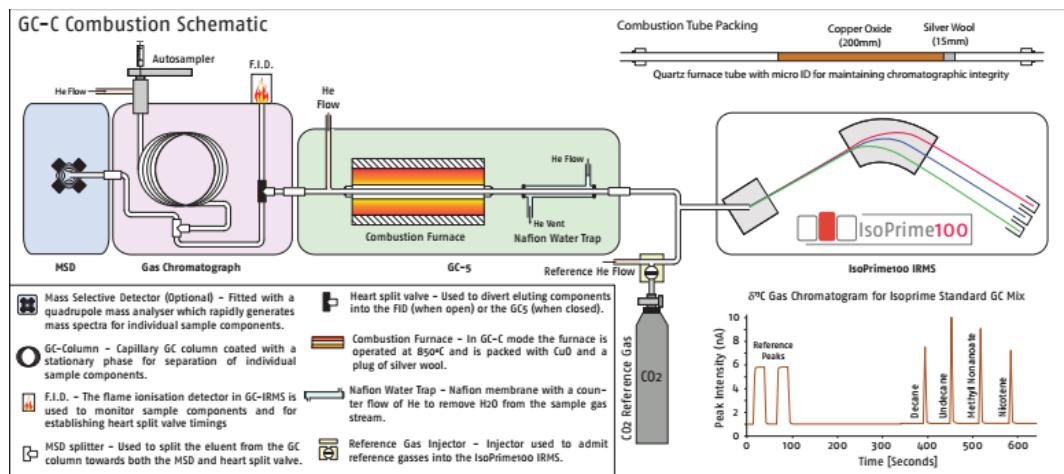
Abstract

We established method for ^{13}C and ^{15}N enrichment determination by using Gaz Chromatography-Combustion-Isotopes Ratios Mass Spectrometry (GC-C-IRMS). In our study, we have tested 4 techniques of derivatization of amino acids (2 acetylation derivatization and 2 alkyl chloroformate derivatization) and 2 columns (Wax and RTX-17) in order to obtain the best separation of amino acids. We chose the derivatizations by alkyl chloroformate to analyze our biological samples on the column RTX-17 because it allowed us to get good chromatograms and to save time. We performed a pilot study on rat by using EA-IRMS so that to determine protein digestibility in milk and spirulina. Then, 12 rats have ingested a meal containing milk

proteins labelled in ^{15}N and spirulina labelled in ^{13}C . The slaughter was done 4 hours after ingestion of the meal for the first group of rats ($n = 6$) and 6 hours after the meal for the second group ($n = 6$). Digestibility of milk proteins in the both groups of rats was $97.82\% \pm 0.33$ and for of proteins of Spirulina is $81.28\% \pm 4.82$. Statistical analyzes we have performed have shown that there was no significant difference between the both groups for the different proteins ($p = 0.89$ for milk protein and $p = 0.205$ for spirulina). However, we observed that the both proteins digestibility were significantly different (P -value <0.0001). We also measured ^{13}C enrichments of individuals AA in plasma, liver and in the digestats. We have obtained in the liver and in the plasma enrichments between 0-0.02 Atom Percent Excess for the whole amino acid. Amino acids enrichments in digestats were between 0.1-0.4APE. ^{15}N enrichments were between 0.2 - 0.3 APE. The concentrations of AA in the digestats were determined by HPLC.

Annexes

Annexe 1 : Principe du GC-C-IRMS (exemple de Isoprime GC5)



ANNEXE 2 : Préparation des réactifs pour l'estérification et du réactif d'acétylation pour les dérivatisations par acétylation

réactif d'acétylation	réactifs d'estérification (1 litre)
<ul style="list-style-type: none"> - Acétone 22.5ml - Triéthylamine 9ml - Anhydride acétique 4.5ml 	<ul style="list-style-type: none"> - Prélever 834ml de 1-propanol ou du Méthanol - Placer le flacon contenant 1-propanol ou méthanol 2h à -20°C - Rajouter 167ml de chlorure d'acyle

Annexe 3:

<u>Préparation de l'OPA</u>
- Peser 15mg OPA
- Solubiliser l'OPA dans 200µL de Méthanol pour HPLC
- Ajouter 1.8 mL du Tampon borate de sodium pH 9.5
- Ajouter 40µL de Mercapto-éthanol
- Filtrer en transférant dans un vial HPLC
<u>Préparation des tampons d'élutions</u>
➤ Tampon A pour 2L
Mélanger : 400mL MeOH HPLC grade ; 1600 mL Acétate de sodium 50Mm pH 5.9 et 20mL de Tétrahydrofuran (THF)
➤ Tampon B pour 2L
Mélanger : 1600mL MeOH HPLC grade et 400mL Acétate de sodium 50Mm pH 5.9
NB : Filtrer le mélange de chaque tampon et les mettre dans des bouteilles propres
➤ Préparation acétate de sodium pH 5.9
Peser 3.11g d'acétate de sodium (Masse molaire = 136.08g/mol) pour 1 L 2.87mL d'acide acétique et ajuster le pH à 5.9 avec de l'acide acétique

Annexe 4 : Les acides aminés et leurs abréviations

Alanine	Ala
Arginine	Arg
Aspartate	Asp
Asparagine	Asn
Cystéine	Cys
Glutamate	Glu
Acide γ -aminobutyrique	Gaba
Glutamine	Gln
Glycine	Gly
Histidine	His
Isoleucine	Ile
Leucine	Leu
Lysine	Lys
Méthionine	Met
Phénylalanine	Phe
Proline	Pro
Serine	Ser
Thréonine	Thr
Tryptophane	Trp
Tyrosine	Tyr
Valine	Val