

“L’HPTLC, outil de caractérisation d’activités enzymatiques et criblage d’actifs naturels végétales ou animaux”

Dr. DA SILVA David

INSTITUT DE CHIMIE ORGANIQUE ET ANALYTIQUE

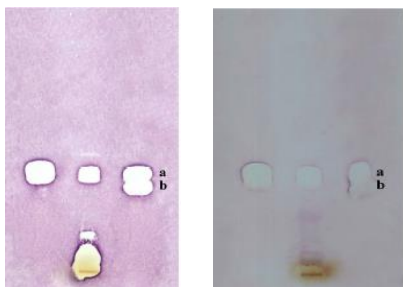


CLUB CCM – 20^{ème} anniversaire

Montpellier, 28 juin 2018

Détection d'agents antimicrobiens

- ☐ Spray de **bactéries**, champignons...

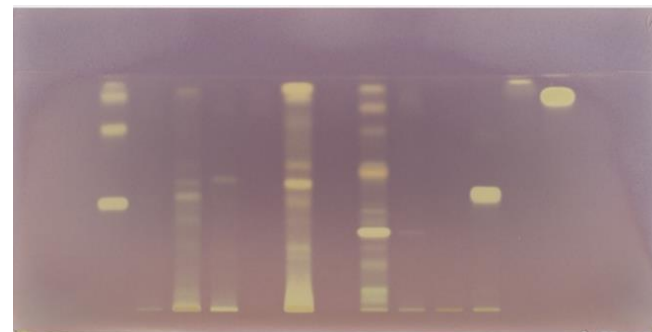


Review, Irena M. Choma et al., Chromatography, 2015, 225-228

Bacillus subtilis Escherichia coli

Détection d'agents antioxydants

- ☐ Spray du **DPPH**, ABTS, β -carotene

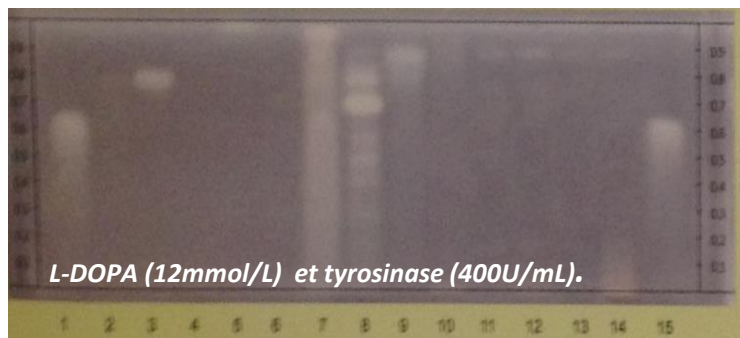


HPTLC-bioautography

Détection des zone(s) bioactive(s)

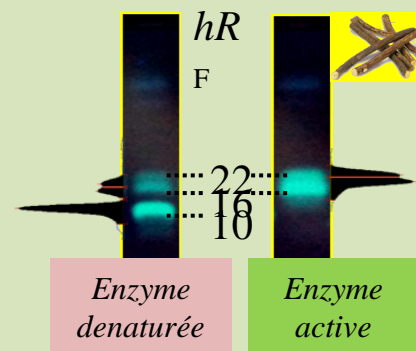
Détection d'inhibiteurs

- ☐ Spray de la **Tyrosinase**, CBHII...



Détection de substrats

- ☐ réaction tube - **Invertase**

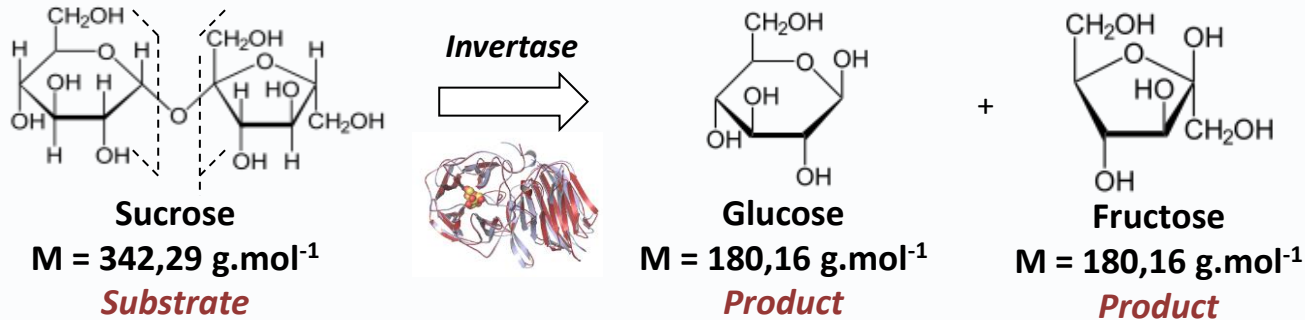


- ☐ L'apport de l'approche quantitative de la TLC et le couplage avec la spectrométrie de masse

☐ **Modèle :**

- Enzyme : **invertase** (β -fructosidase), hydrolyse spécifique du saccharose

Hydrolyse du saccharose par l'invertase



Caractérisation de l'invertase par Michaelis-Menten

Colorimétrie

- Rapide
- Détection indirecte
- Détection non spécifique



TLC-UV

- Détection directe
- Détection spécifique

Protocole TLC-UV



Plaque de **silice** 60F₂₅₄
Imprégnation :
 Bisulfate de sodium,
 citrate

Chauffage à l'étuve,
 100°C, 1h

Dépôts
2 migrations (6,5cm)
ACN/H₂O 80/20 (v/v)

Dérivation par immersion
Acide 4-aminobenzoïque

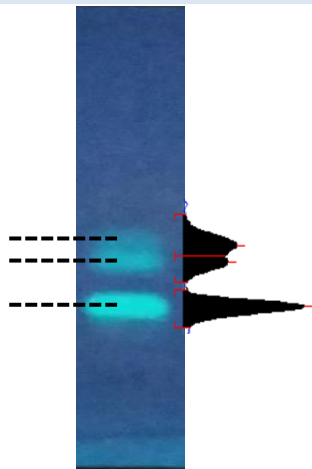
Chauffage 130 °C, 15 min
 Lecture densitométrique :
390 nm

Résultats

Validation de méthode (ICH guidelines Q2(R1))

- *Spécificité, précision, robustesse, limites de quantification et de détection (RDS <20%)*

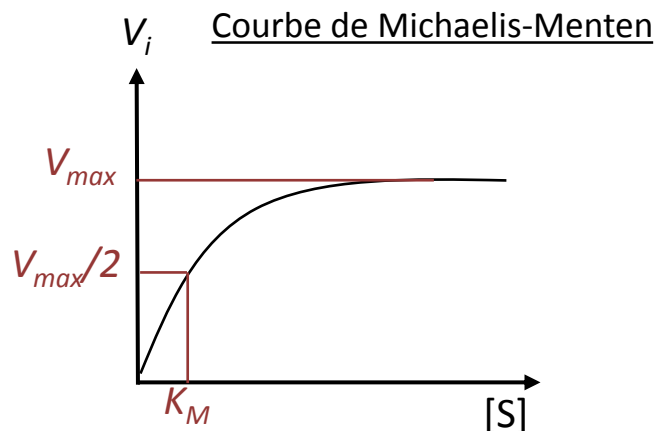
hR_F (fructose) = 22
 hR_F (glucose) = 16
 hR_F (sucrose) = 10



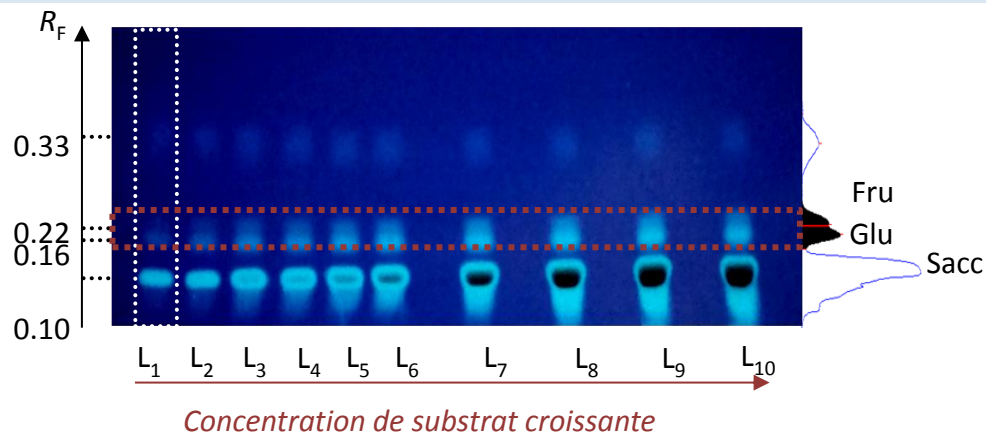
- ✓ Séparation suffisante pour une approche quantitative
- ✓ Faisabilité de la caractérisation enzymatique

[1] FERREY J., Da SILVA D., J Chrom A, 2016, 1477, 108-113

Principe de l'étude de Michaelis-Menten



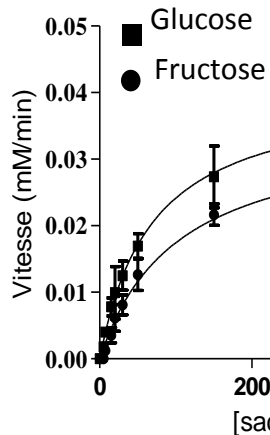
Expérience de Michaelis-Menten par TLC-UV



➤ Quantification spécifique du glucose et du fructose

Détermination des paramètres cinétiques

[1] FERREY J., Da SILVA D., J Chrom A, 2016, 1477, 108-113

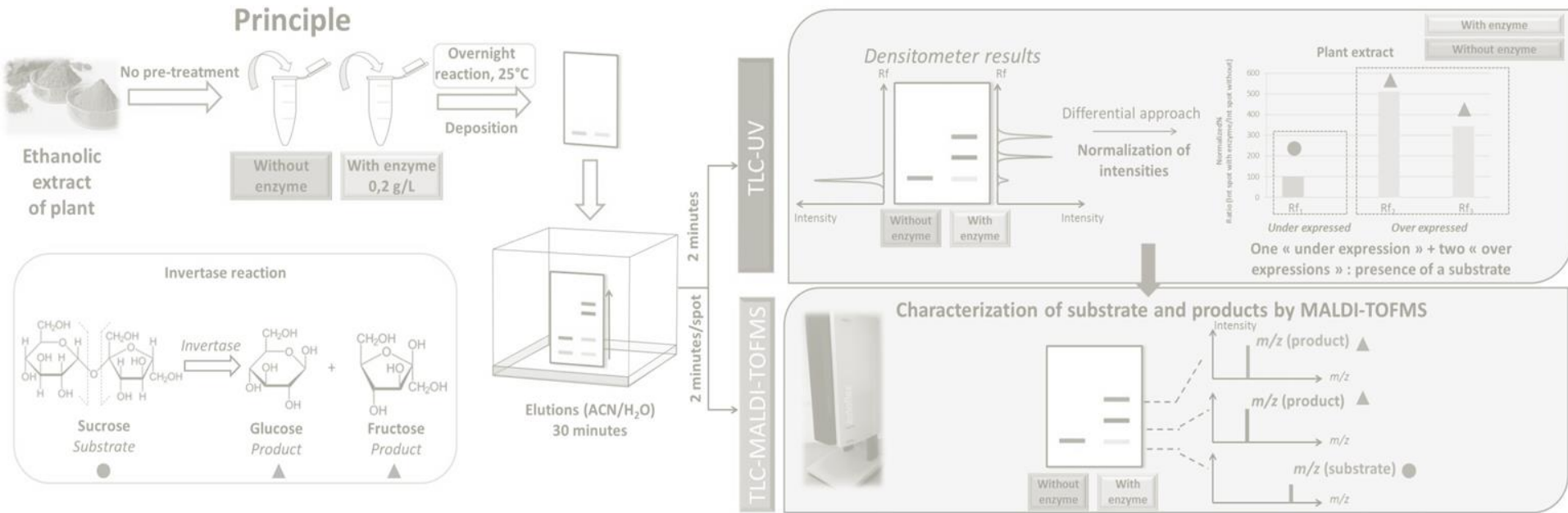


Analyse TLC-UV		
Produits	K_M (mM)	V_{max} (mM/min)
Glucose	63.09 ± 7.590	0.037 ± 0.00094
Fructose	83.01 ± 14.39	0.031 ± 0.0021

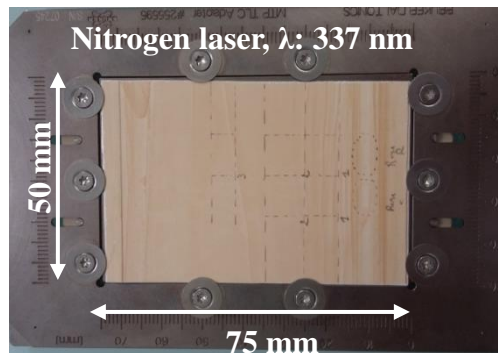
① Caractérisation de l'activité

② Criblage de substrat





TLC-MALDI-TOFMS

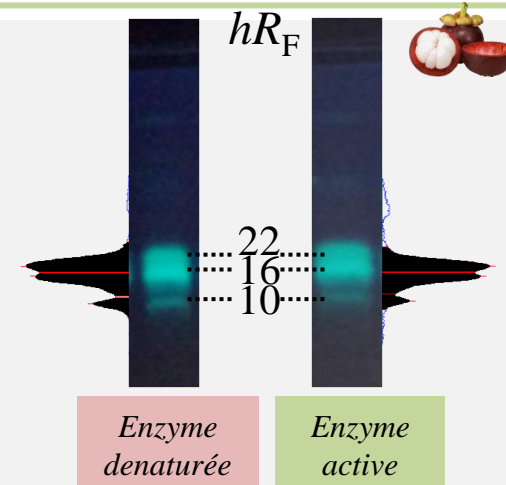
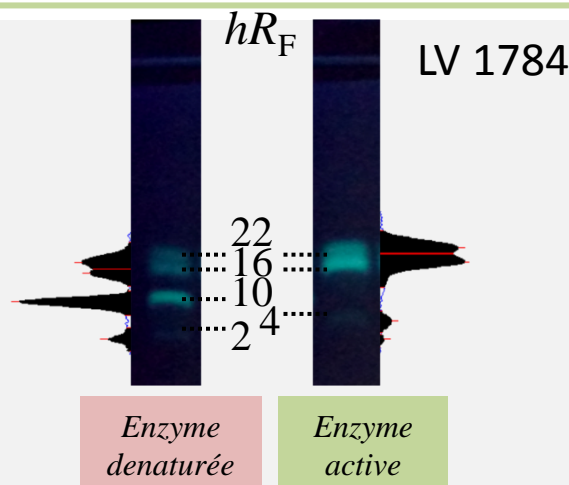
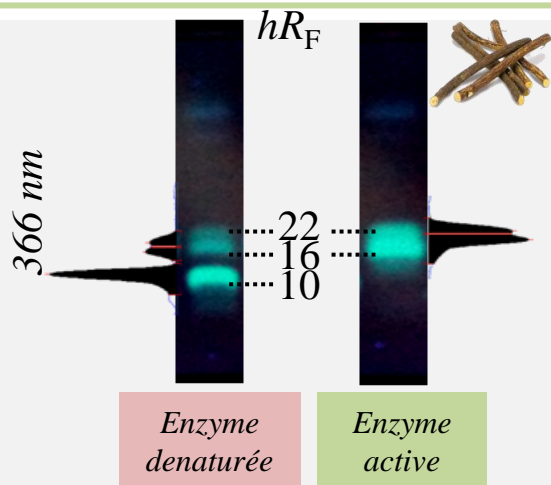


TLC plate

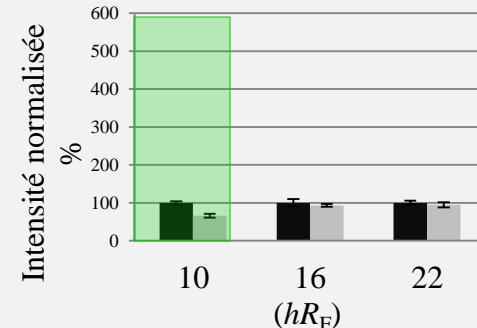
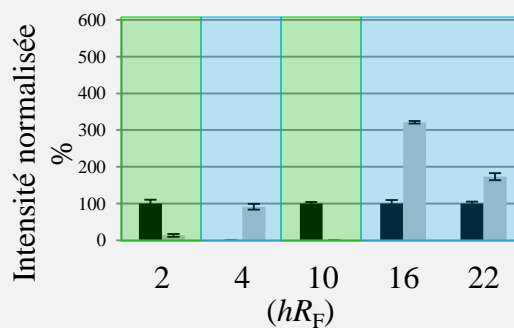
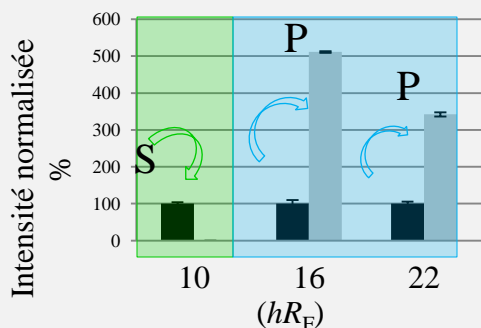


MALDI-TOFMS

Analyses densitométriques



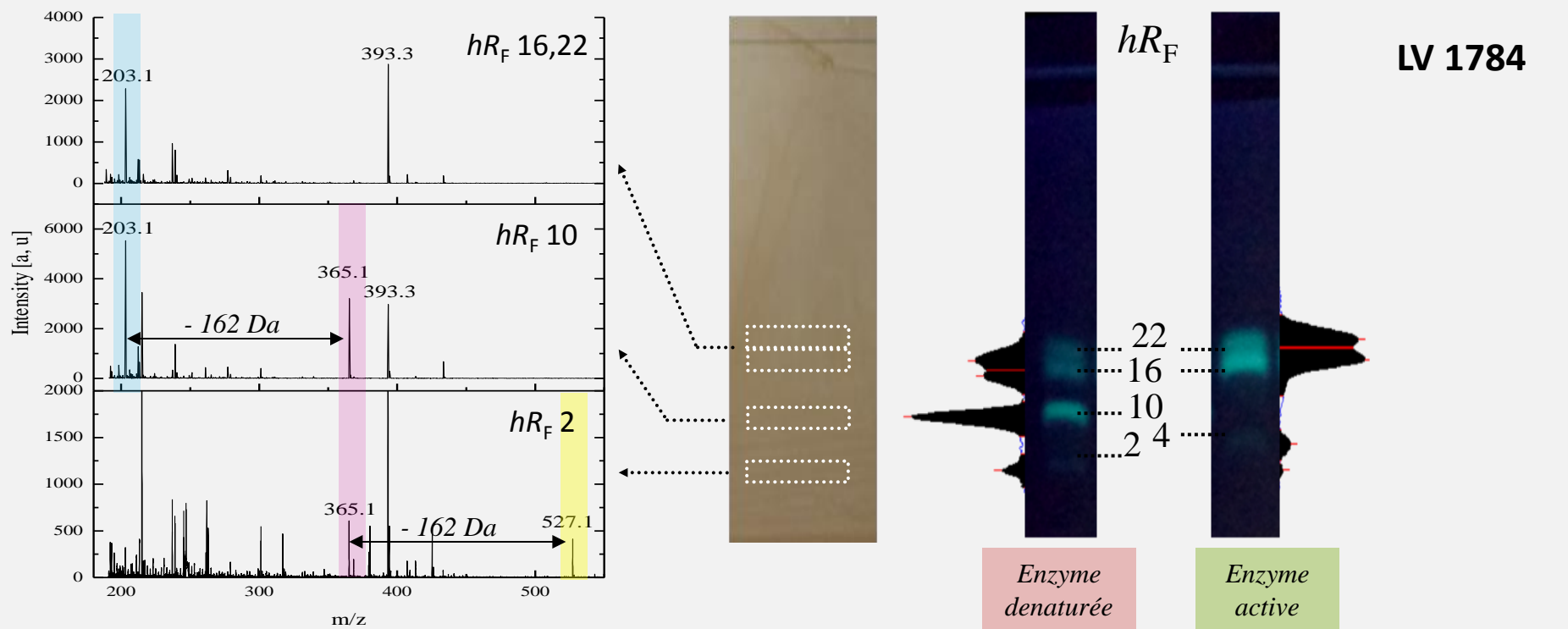
Approche différentielle



□ Pas ou peu d'effet matrice

✓ Apport de la TLC-UV : Détection rapide de la présence de substrat de l'invertase

□ Apport du couplage TLC-MALDI : empreinte massique du substrat et des produits ?



Spectres de masse du LV 1784 en mode positif $[M+Na]^+$

✓ L'apport de la dimension séparative et de l'information massique a permis de conclure sur :

Zone 2 : raffinose (m/z 527 et fragment)

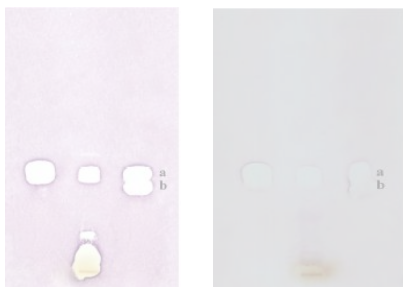
Zone 4 : lactose (m/z 365 sans fragment)

Zone 10 : saccharose (m/z 365 et fragment)

Zone 16 et 24 : glucose/fructose (m/z 203)

Détection d'agents antimicrobiens

- ☐ Spray de **bactéries**, champignons...

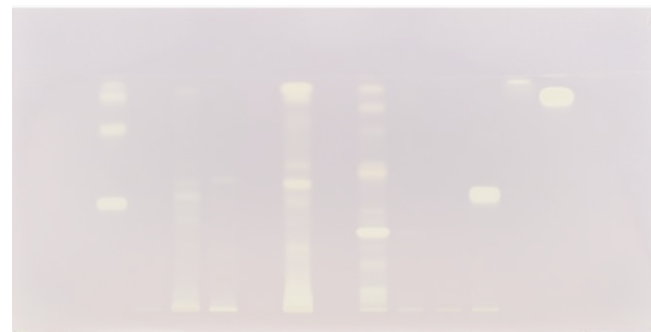


Review, Irena M. Choma et al., Chromatography, 2015, 225-228

Bacillus subtilis Escherichia coli

Détection d'agents antioxydants

- ☐ Spray du **DPPH**, ABTS, β -carotene

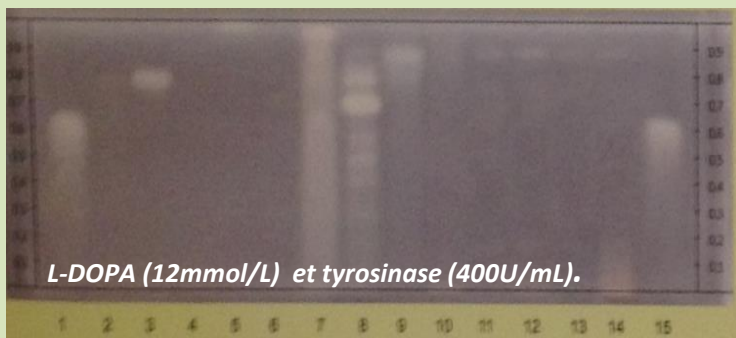


TLC-bioautography

Detection des zone(s) bioactive(s)

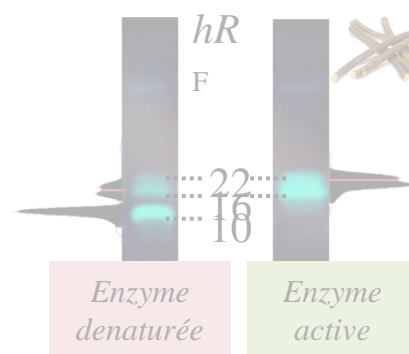
Détection d'inhibiteurs

- ☐ Spray de la **Tyrosinase**, CBHII...



Détection de substrats

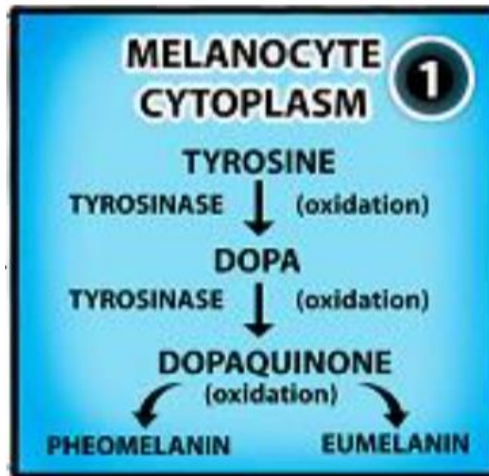
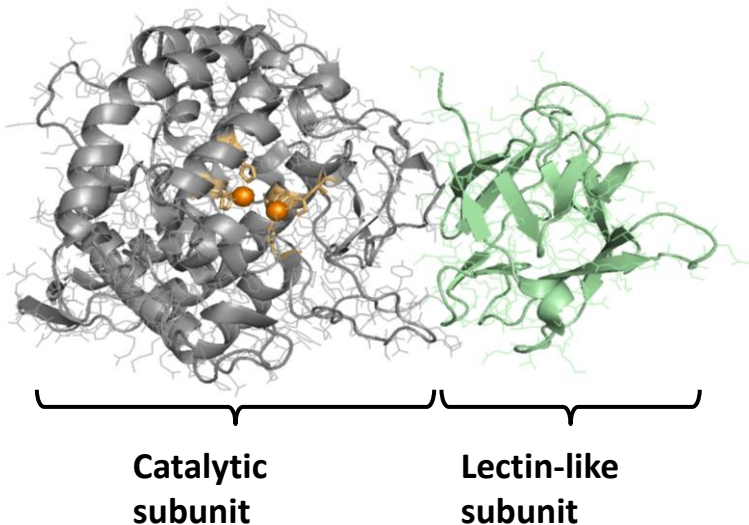
- ☐ réaction tube - **Invertase**



- ☐ L'apport de l'approche de la TLC et le couplage avec la spectrométrie de masse

□ **Modèle dermacosmétique :**

- Enzyme : **Tyrosinase**



Criblage d'inhibiteurs de la Tyrosinase

Colorimétrie

- Rapide
- Détection indirecte
- Interfèrent de la couleur de l'extrait



TLC-lumière blanche

- Détection directe de l'inhibiteur(s)
- Détection spécifique
- influence de la couleur de l'extrait minisée

Protocole TLC- Inhibiteur / Tyrosinase



Derivatizer



Derivatizer



Chauffage 130 °C, 15 min



TLC visualizer

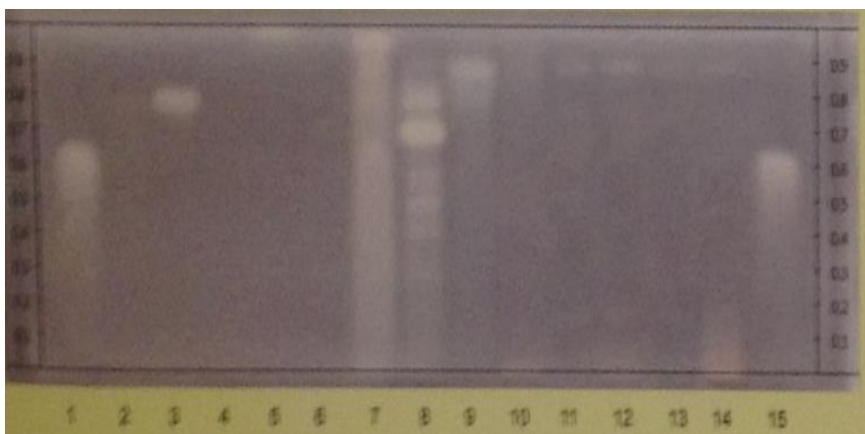
Dépôts **migrations** (6,5cm)
ACN/H₂O 80/20 (v/v)

Spray de l'enzyme
Tyrosinase 400 U/mL,
Incubation 10 min

Spray du substrat
L-DOPA 12 mmol,
Incubation 10 min

Visualiseur:
lumière blanche

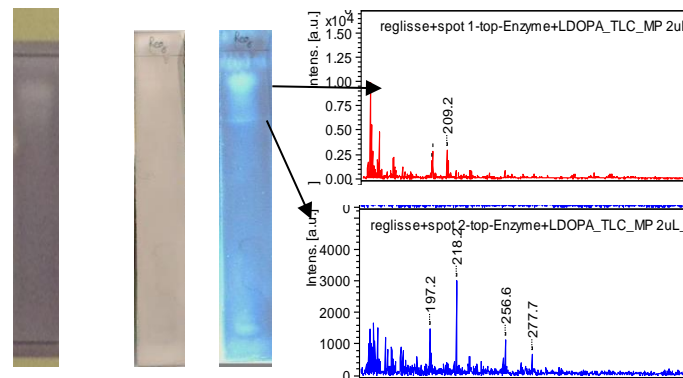
[1] Ankli A et al. Prevention of False-Positive Results: Development of an HPTLC Autographic Assay for the Detection of Natural Tyrosinase Inhibitors. *Planta Medica*, 2015; 81(12/13): 1198-1204



Expérience TLC-MALDI-TOF MS

A. HPTLC Autography Assay

B. TLC@MALDI MS



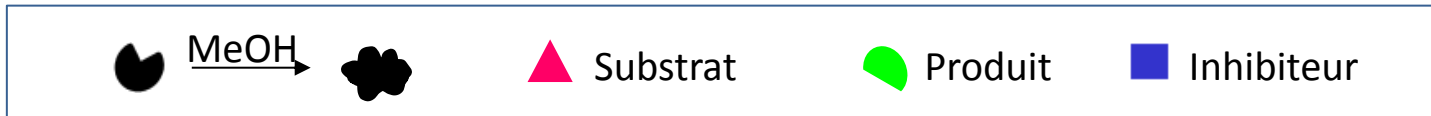
Article [1] visible 366 nm



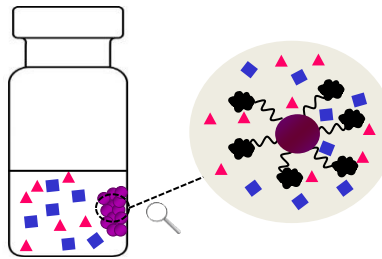
[1] Ankli A, HPTLC Autographic Assay for the Detection of Natural Tyrosinase Inhibitors. *Planta Medica*, 2015; 81(12/13): 1198-1204

Objectif: détermination simultanée de l'effet inhibiteur et substrat de ligands au sein d'un milieu

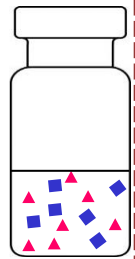
Méthodologie: immobilisation covalentes des enzymes sur des billes magnétiques



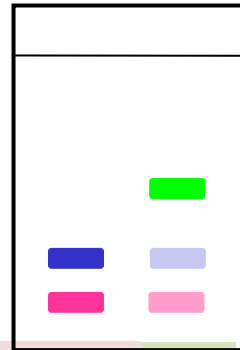
Enzyme dénaturée (Den)



Ion Fading

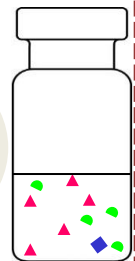
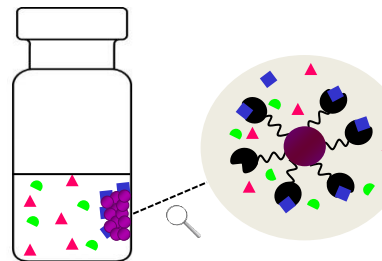


Ion Fading



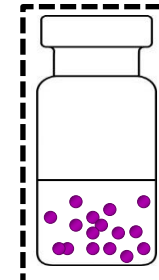
Den Act

Enzyme active (act)

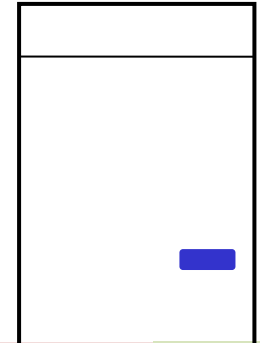


i) Lavage tampon
 ii) Dénaturation avec MeOH et chauffage

Ion Hunting



Ion Hunting



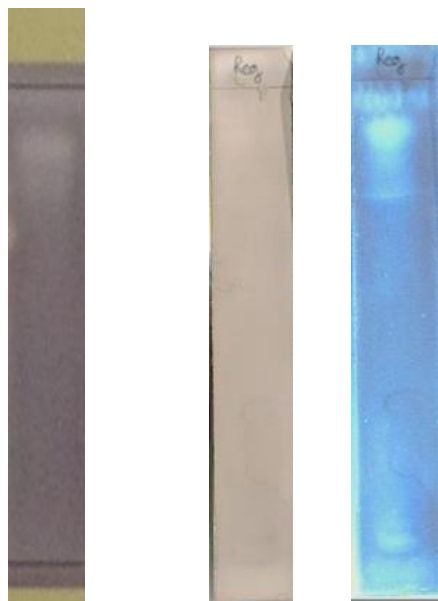
Den+ MeOH Act+ MeOH

❑ Evaluation de l'apport de l'approche de la Enzyme couplée à une Nanoparticule @ TLC ?



Criblage d'inhibiteur de la Tyrosinase par EN@TLC

A. HPTLC Autography Assay

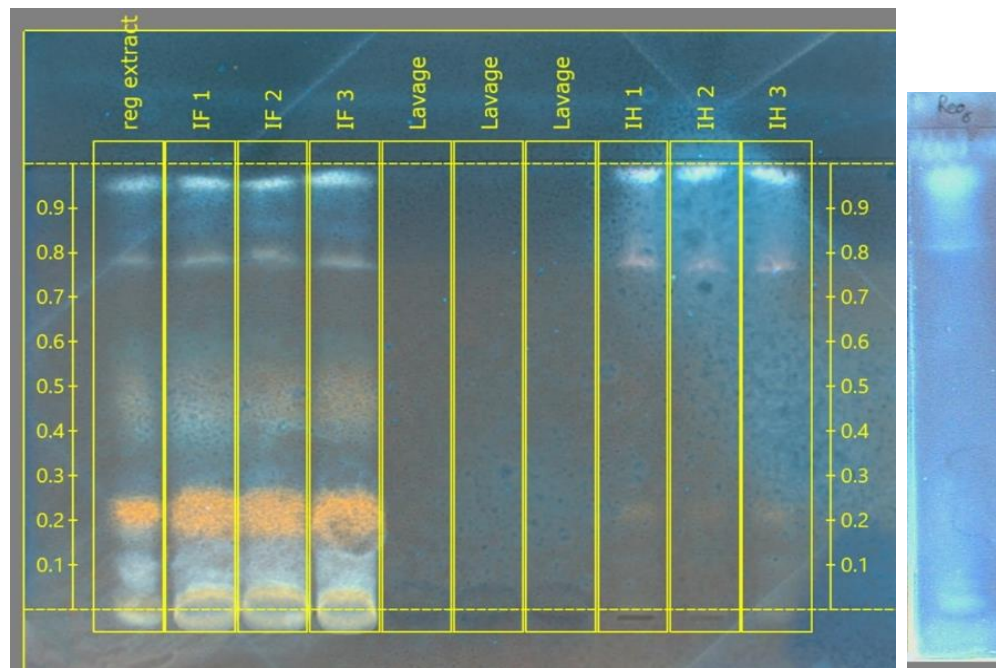


Article [1]

visible

366 nm

B. Enzyme Nanoparticules @ TLC



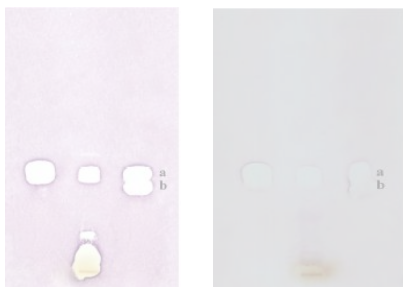
Neu-PEG at 366 nm

366 nm

- ✓ **Consommation plus faible d'enzymes et stabilité augmenté**
- ✓ **Mesure d'une interaction Ligand/enzyme, compatible avec une revelation Neu-PEG**
- ✓ **Complémentarité avec l'approche de pulvérisation**

Détection d'agents antimicrobiens

- ☐ Spray de **bactéries**, champignons...

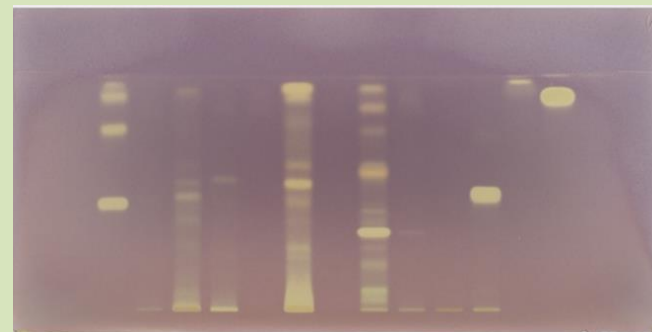


Review, Irena M. Choma et al., Chromatography, 2015, 225-228

Bacillus subtilis Escherichia coli

Détection d'agents antioxydants

- ☐ Spray du **DPPH**, ABTS, β -carotene

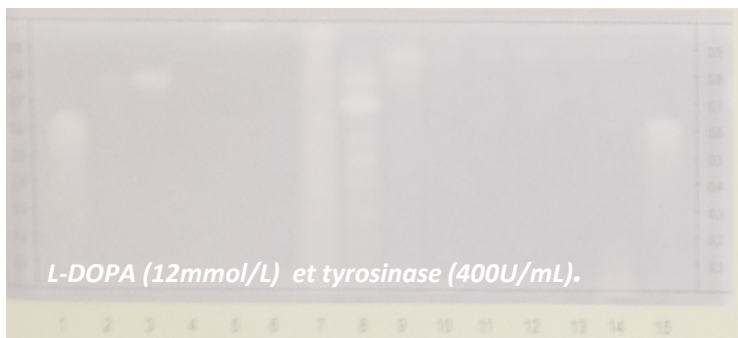


TLC-bioautography

Détection des zone(s) bioactive(s)

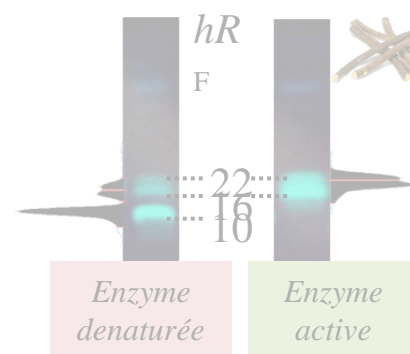
Détection d'inhibiteurs

- ☐ Spray de la **Tyrosinase**, CBHIII...



Détection de substrats

- ☐ réaction tube - **Invertase**



- ☐ L'apport de l'approche de la TLC et le couplage avec la spectrométrie de masse

Faible volume – Fortes réactions



Venin de Frelon est un mélange complexe:

- Protéines
- Peptides
- Petites molécules (phéromones, acides aminés)



Sac à venin
1mm long
V < 1 µl



échantillonnage

Activité antioxydante

Criblage d'activité



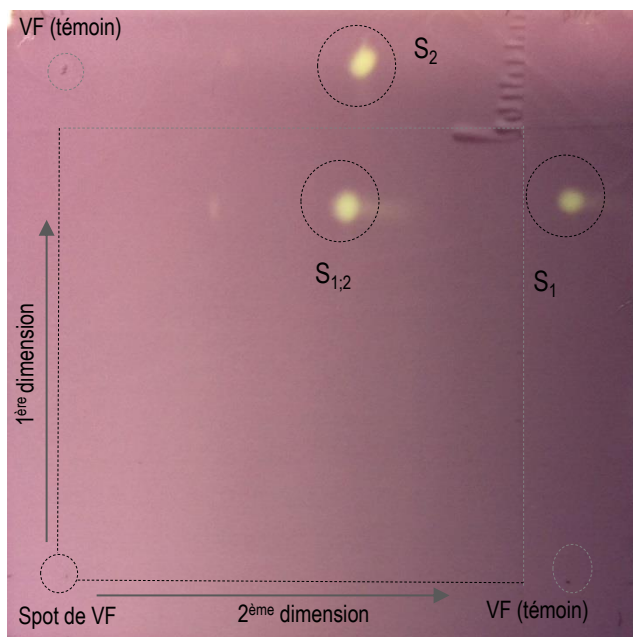
Purification et Identification



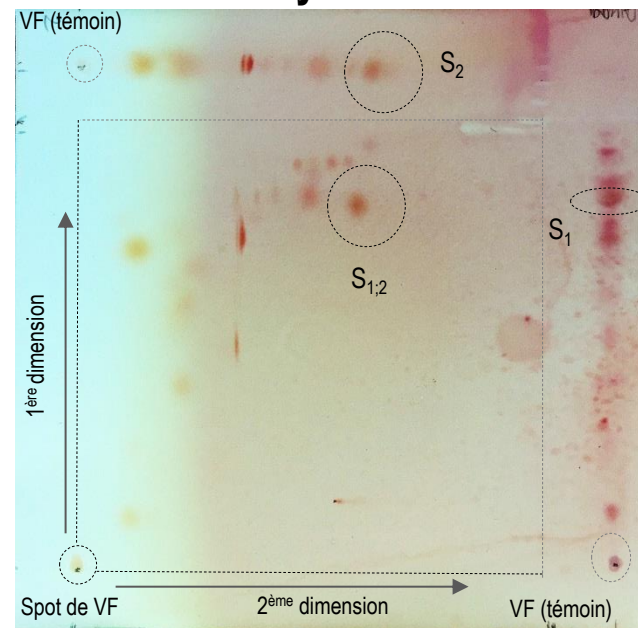
NOUVEL INGREDIENT

Application en cosmétique

1. DPPH



2. Ninhydrine



Profil de CCM du venin brut (VF) sur la plaque de gel de silice 60 F₂₅₄ (Merck)

1^{ère} dimension: (Chloroforme : Méthanol : Ammoniaque 28% ; 2:2:1)

2^{ème} dimension: (1-Butanol : a acétique : eau ; 4:1:2)

Révélateurs : 1. DPPH/Méthanol, immersion (spot jaune composés antioxydants)

2. Ninhydrine/éthanol, 120°C pendant 3 min (spot orange-jaune pour acide aminé)

IC₅₀_{VF} = 141,618 ± 1,795 µg/mL

IC₅₀ du venin d'abeille = 451±6 ug/mL

Sobral F, Sampaio A, Falcão S, Queiroz MJRP, Calhelha RC, Vilas-Boas M, et al. Chemical characterization, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties of bee venom collected in Northeast Portugal. Food Chem Toxicol. 1 août 2016;94(Supplement C):172-7.

Caractérisation de l'activité enzymatique de l'invertase

- ✓ Approche TLC parfaitement adaptée au suivi cinétique de l'invertase
- ✓ Criblage de substrats de l'invertase par approche différentielle TLC-UV et identification par TLC-MALDI-TOF MS

Enzyme-couplée à des Nanoparticules @ TLC

- ✓ Développement d'une nouvelle méthode de suivi d'interaction Ligand / enzyme (Inhibiteur / Tyrosinase)
- ✓ Complémentarité avec l'approche de mesure de l'inhibition par pulvérisation d'enzyme sur plaque

Criblage de molécules antioxydantes issues du venin

- ✓ Une approche classique de révélation DPPH a mis en avant la présence d'une molécule antioxydante
- ✓ Le spot a ensuite été récupéré et analysé par HRMS pour une identification

L'équipe analytique

Justine Ferey (PHD)
Le Thao Nhi (PHD)
Laetitia Fougère (PHD & IE)

Benoît MAUNIT
Cyril COLAS (CBM & ICOA)
Emilie Destandau

La Région Centre



Collaborateurs

Richard DANIELLOU (ICOA)
Pierre LAFITE (ICOA)
Yoan LAURENT (CBM)
Patrick BARIL (CBM)
Eric DARROUZET (IRBI)
Lucie PETIT LESEURRE (CHIMEX)

ARD 2020



—  [cosmetosciences.org](https://www.cosmetosciences.org) —

Merci à Chromacim, au club CCM, à SANOFI
et merci à vous pour votre attention.