

sanofi

estbb^{UCLy}
École d'Ingénieurs en Biotechnologies



Comment l'HPTLC constitue un bon outil d'investigation pour nos recherches dans le domaine de la nutrition ?

07 décembre 2023

Marion LETISSE
MC INSA de Lyon
Laboratoire CarMeN

INSA INSTITUT NATIONAL
DES SCIENCES
APPLIQUÉES
LYON



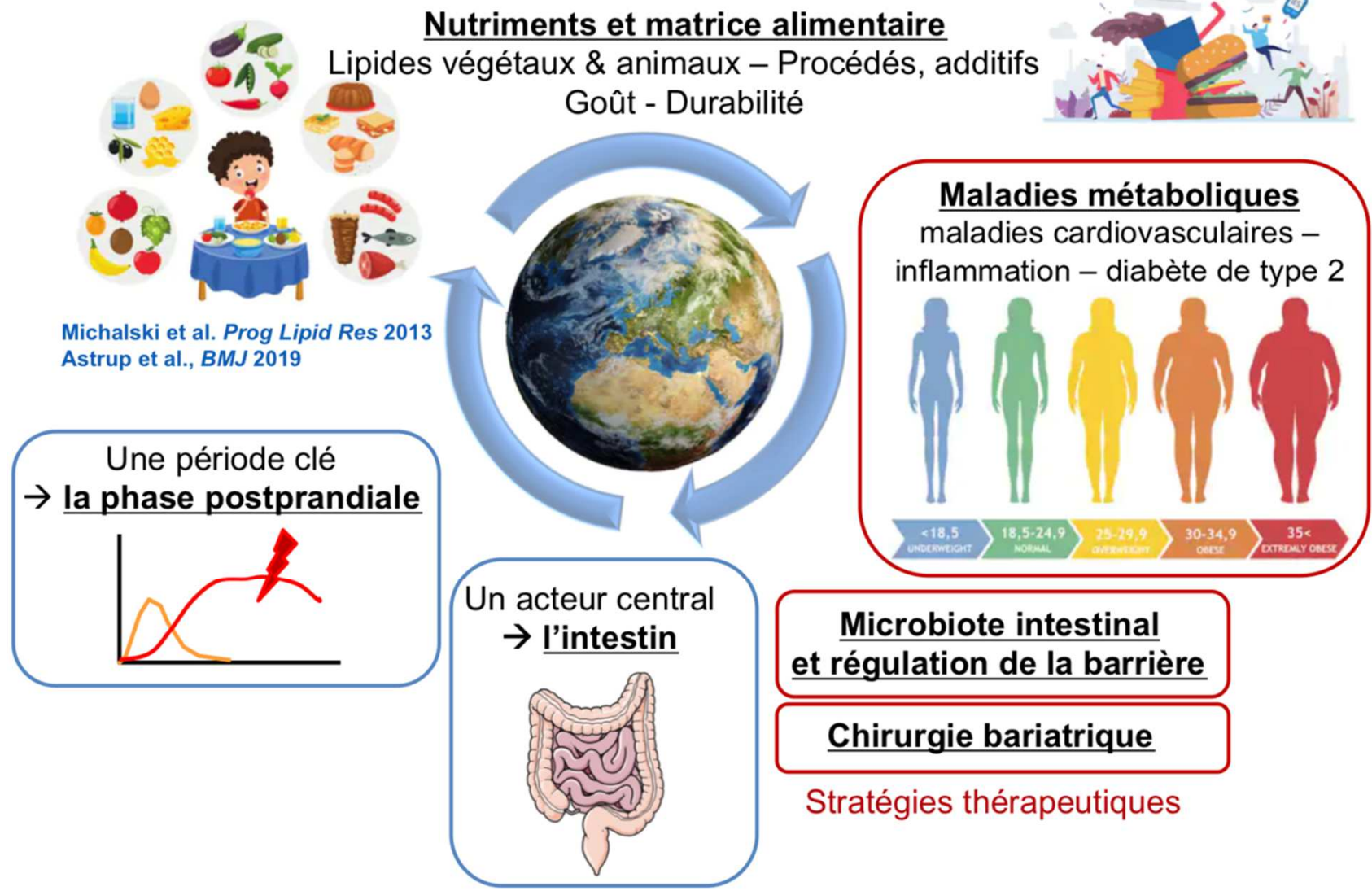
INRAE

Inserm



CRNH
CENTRE DE RECHERCHE
EN NUTRITION HUMAINE
RHÔNE-ALPES

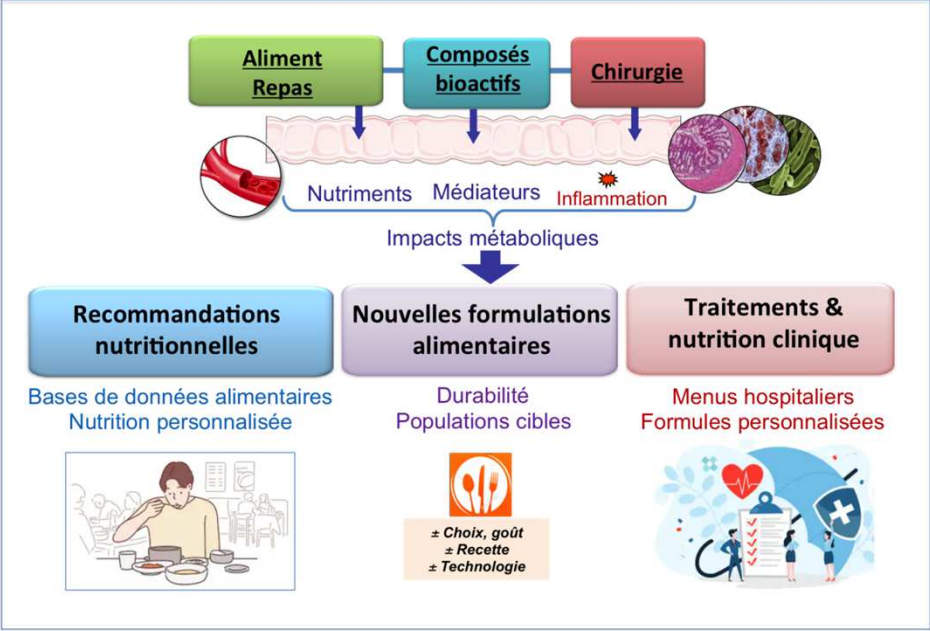
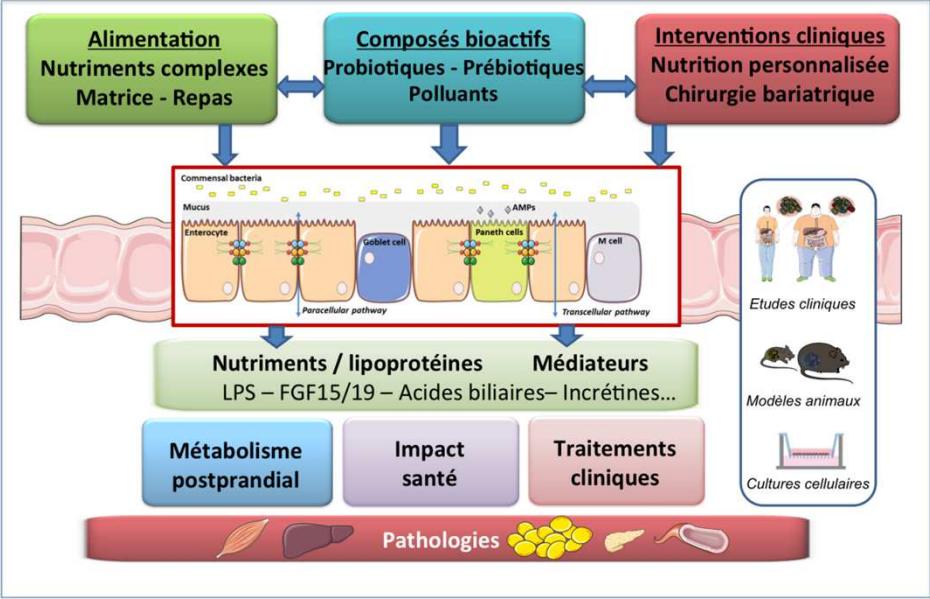
Le laboratoire CarMeN et l'équipe DO-IT en quelques mots



Objectifs de recherche

Décrypter le rôle de la structure complexe des aliments et des additifs, ingrédients ou polluants, dans la santé et les maladies

Proposer des stratégies innovantes de prévention et de guérison des maladies métaboliques en ciblant l'intestin



Objectifs de recherche

Lipides polaires alimentaires

Lipides « lents vs rapides »

Prébiotiques, amidon lentement digestible, polyphénols, lipides bioactifs et stratégies synergiques multifonctionnelles → risque cardiométabolique

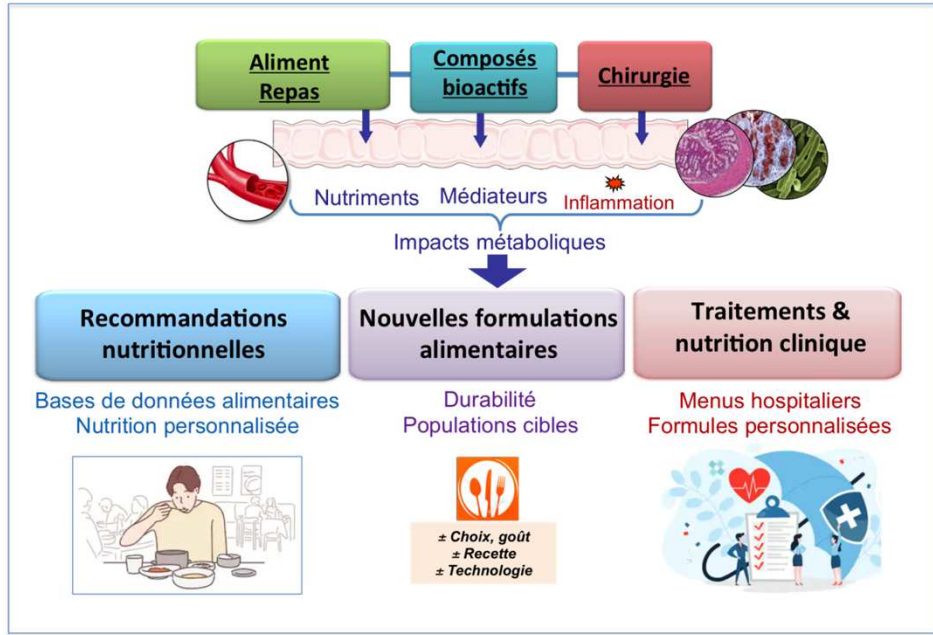
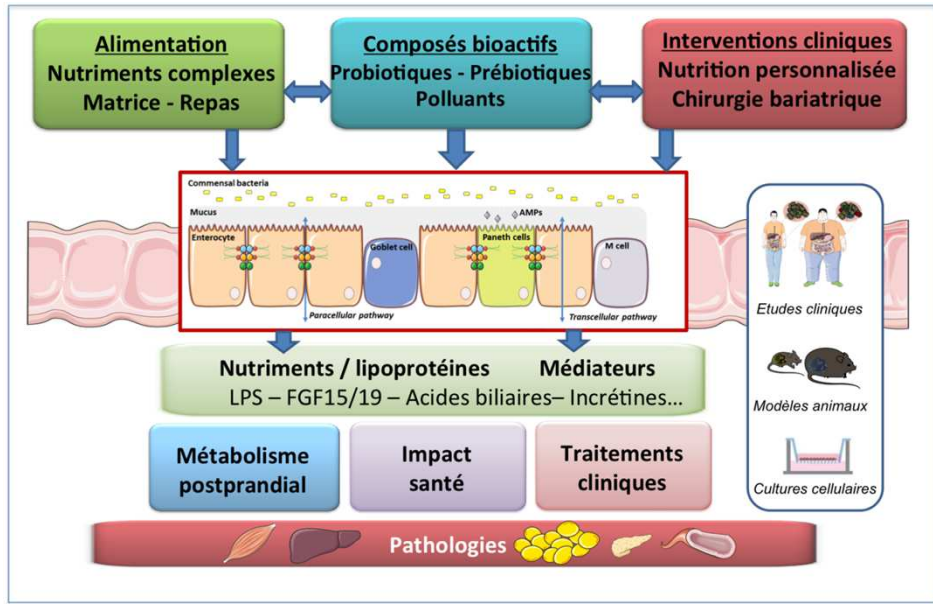
Probiotiques → diabète et autres maladies métaboliques

Médiateurs métaboliques d'origine intestinale

Médecine bariatrique personnalisée

Impacts sur le tissu adipeux et les cellules souches adipocytaires

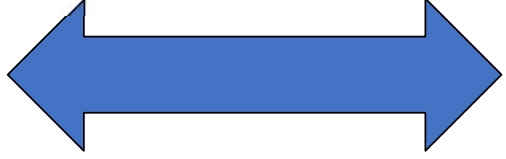
Modélisation mathématique de l'absorption des lipides et de la réponse postprandiale



Evaluation et diversification des sources de lipides bioactifs à partir de végétaux



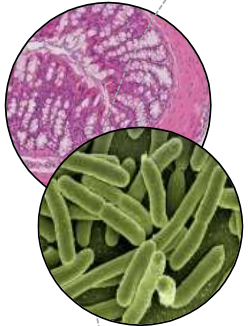
± Transformations liées à la préparation des aliments : cuisson, technologies impactant la matrice alimentaire



Propositions aux partenaires industriels



Goût – Plaisir – Comportement alimentaires



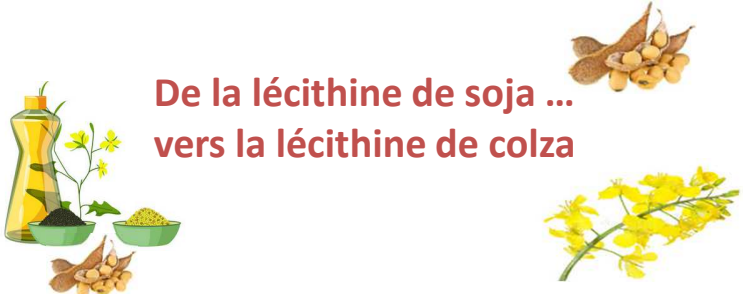
**Absorption intestinale :
Microbiote
Barrière intestinale**



**Santé
Métabolisme**

Lécithines végétales

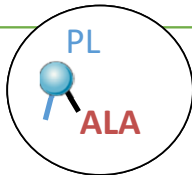
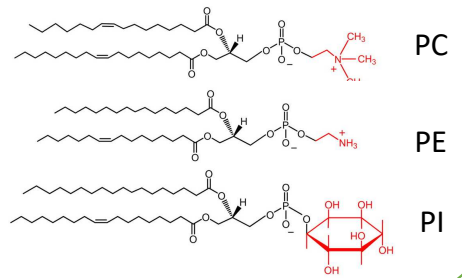
En France : **3^{ème}** additif le plus utilisé (E322)
 17% des aliments transformés contiennent de la lécithine



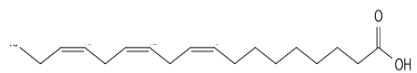
De la lécithine de soja ...
 vers la lécithine de colza

E322

Mélange de lipides complexes
 > 50% de phospholipides (PL)



Acide gras ω 3 essentiel

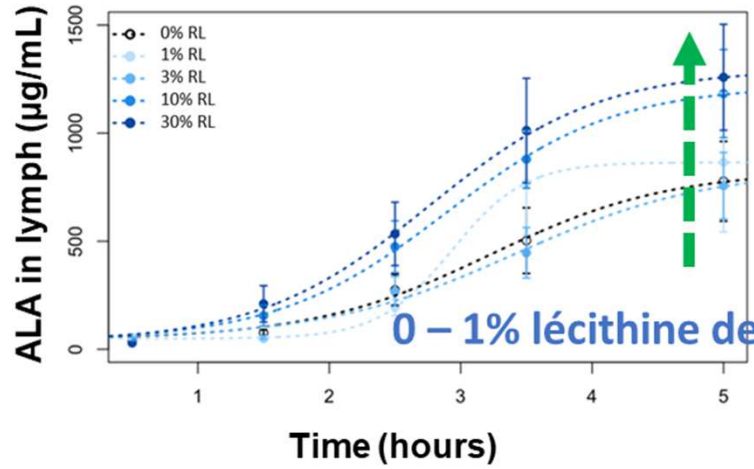


- Pollution liée à l'importation
- Recours aux glyphosates pour la culture
- Utilisation de phyto-oestrogènes
- Présence d'organismes génétiquement modifiés

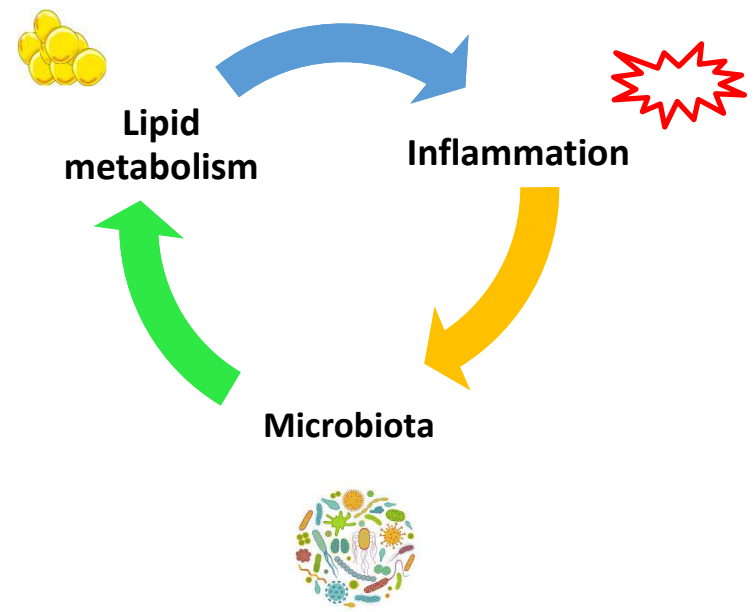


Lécithines végétales

10 – 30% lécithine de colza



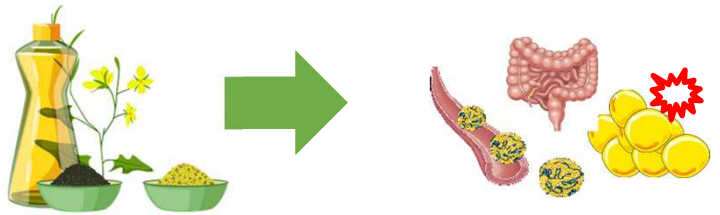
0 – 1% lécithine de colza



La lécithine de colza favorise l'absorption intestinale des $\omega 3$

Implication dans l'inflammation

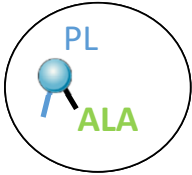
Impact à long terme des lécithines de colza, sources d'ALA versus soja chez des souris nourries en High Fat Diet équilibrées en ALA



Pas d'impact sur le métabolisme des lipides, la barrière intestinale et l'inflammation



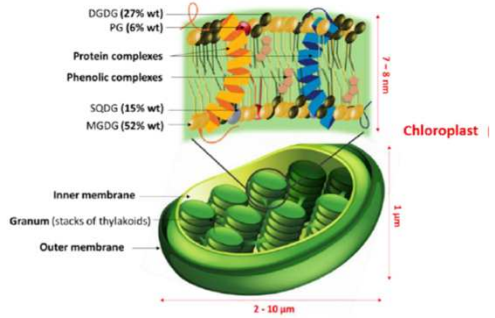
↗ *diversité du microbiote*



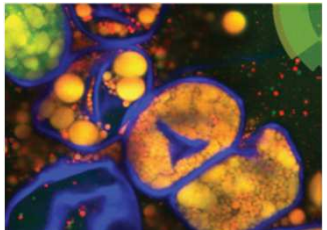
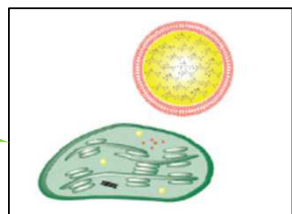
La lécithine de colza constitue-t-elle une bonne alternative à la lécithine de soja ?



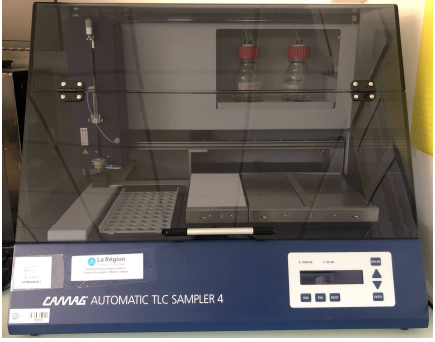
→ Effet d'autres lipides polaires végétaux ?



Galactolipides :
Effets au niveau de l'intestin et conséquences métaboliques



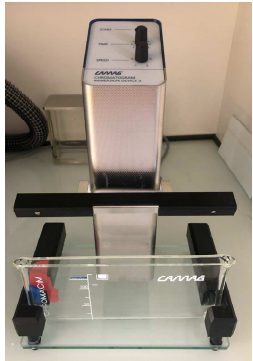
Installation HPTLC au laboratoire CarMeN



Déposeur automatique
ATS 4



Cuve automatique
pour plaques ADC 2

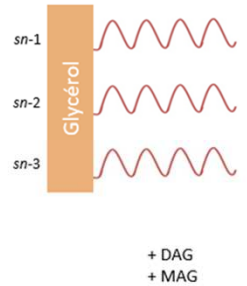


Dispositif de
révélation par
immersion III

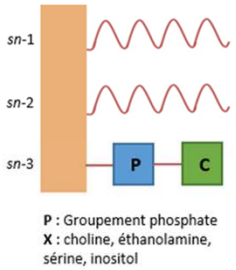


Détecteur Visualizer 2
système de
photodocumentation

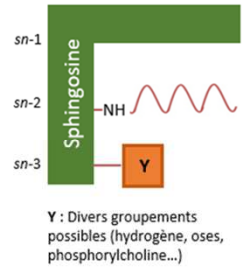
Triglycérides (TAG)



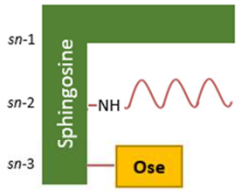
Phospholipides (PL)



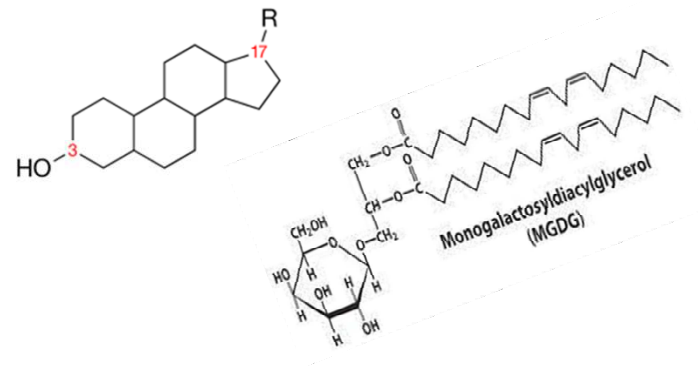
Sphingolipides



Glycolipides



Stérols

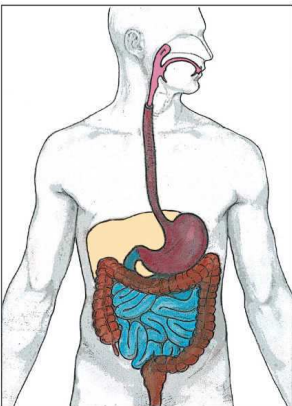


Lipides neutres

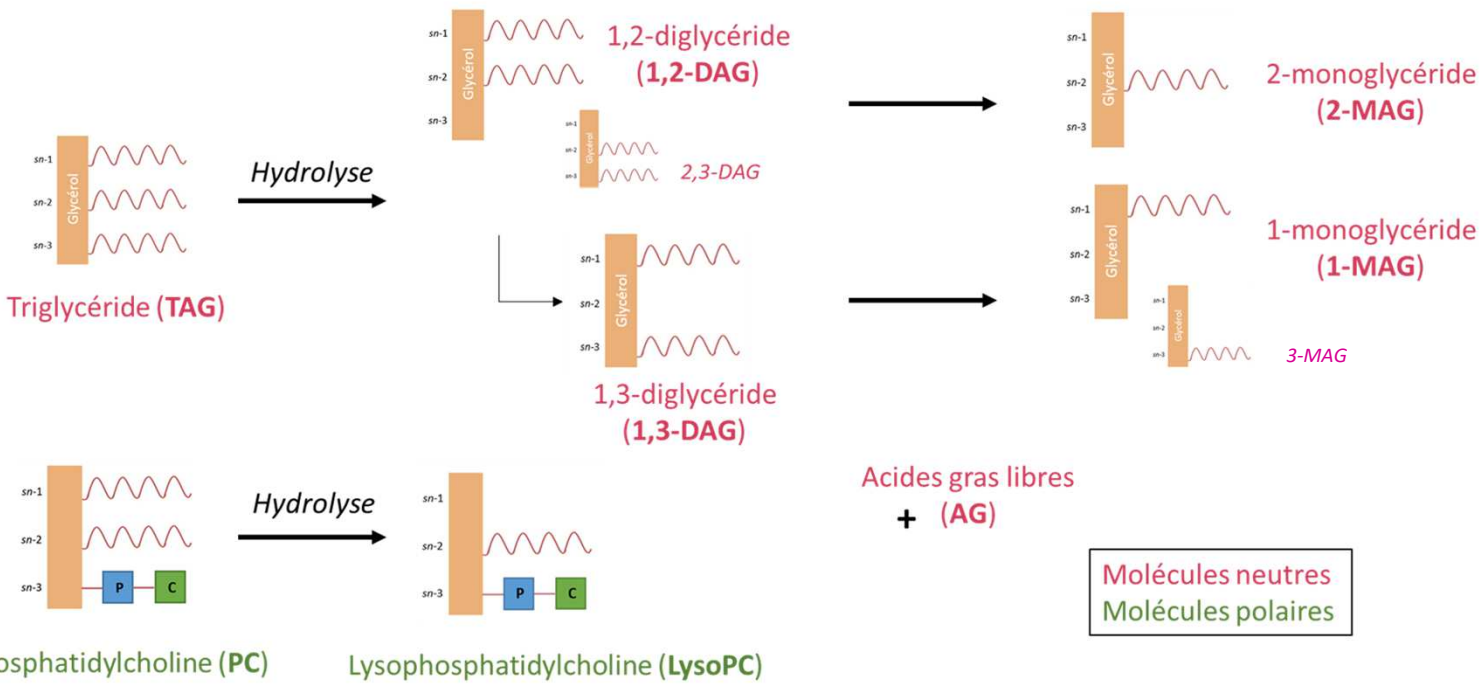
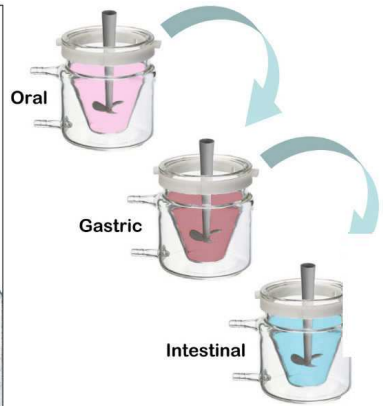
Lipides polaires

Exemple d'application : suivi de la digestion *in vitro*

Protocole du consortium INFOGEST – suivi au pH-stat

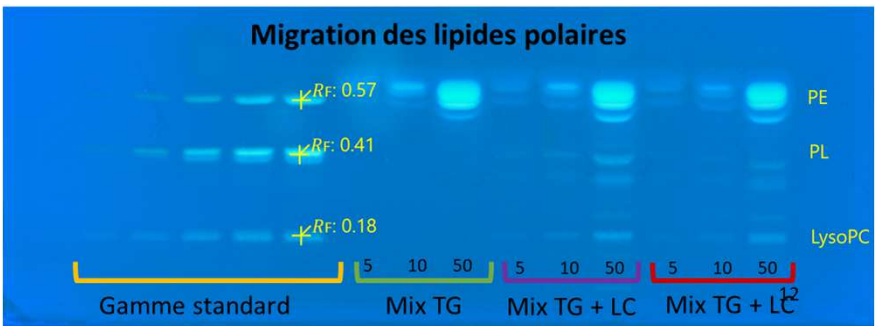
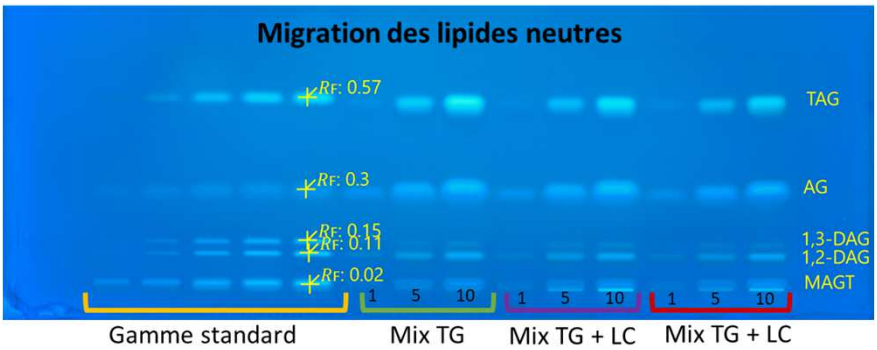


© Lipolytech
All Rights Reserved

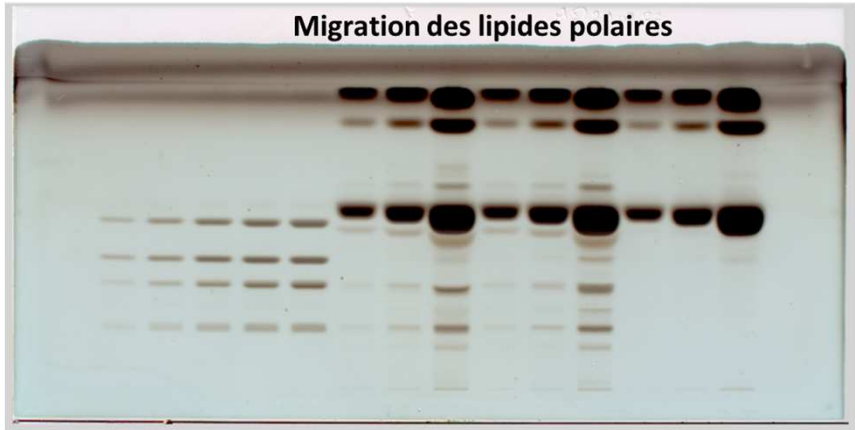
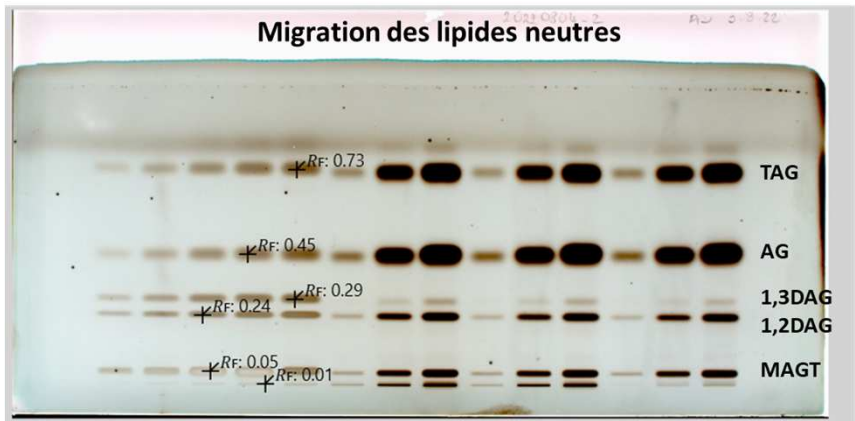


Exemple d'application : suivi de la digestion *in vitro*

Révélation par immersion dans une solution de primuline
Détection à 366 nm



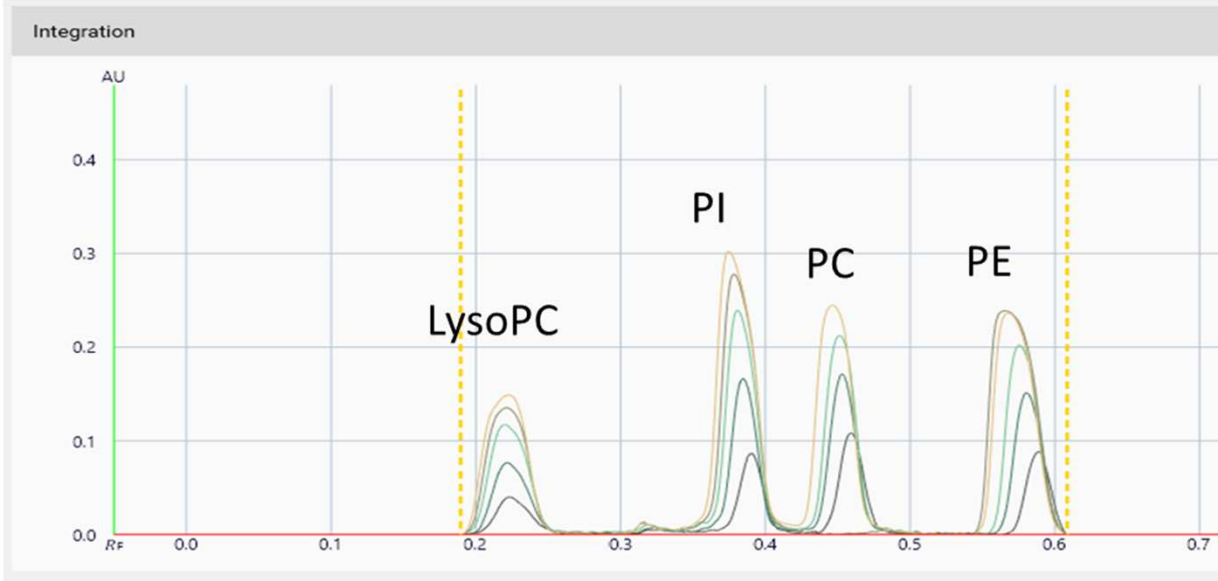
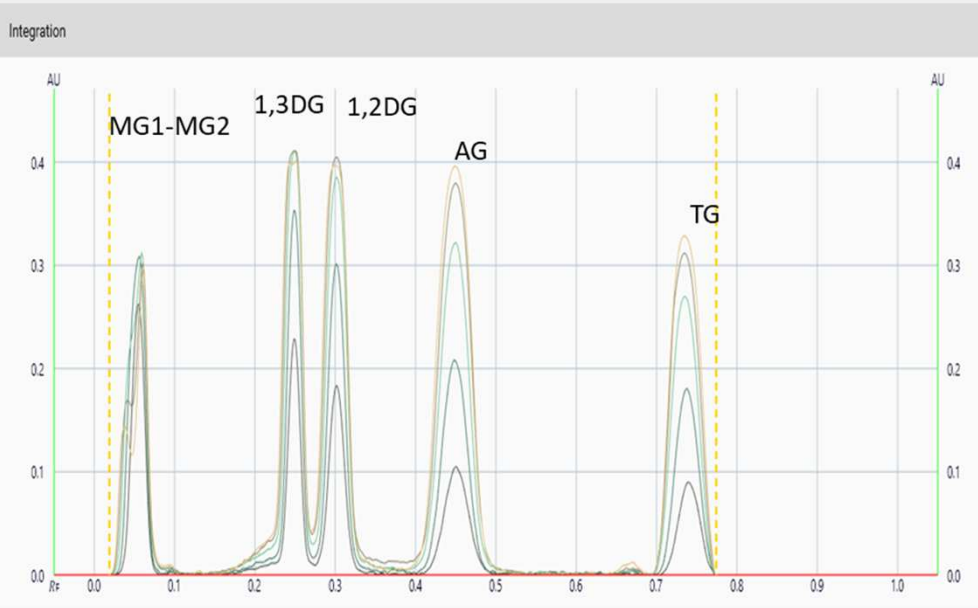
Révélation par immersion dans une solution de sulfate de cuivre
Détection en lumière blanche



Migration
 Heptane/éther/acide formique (55/45/1)

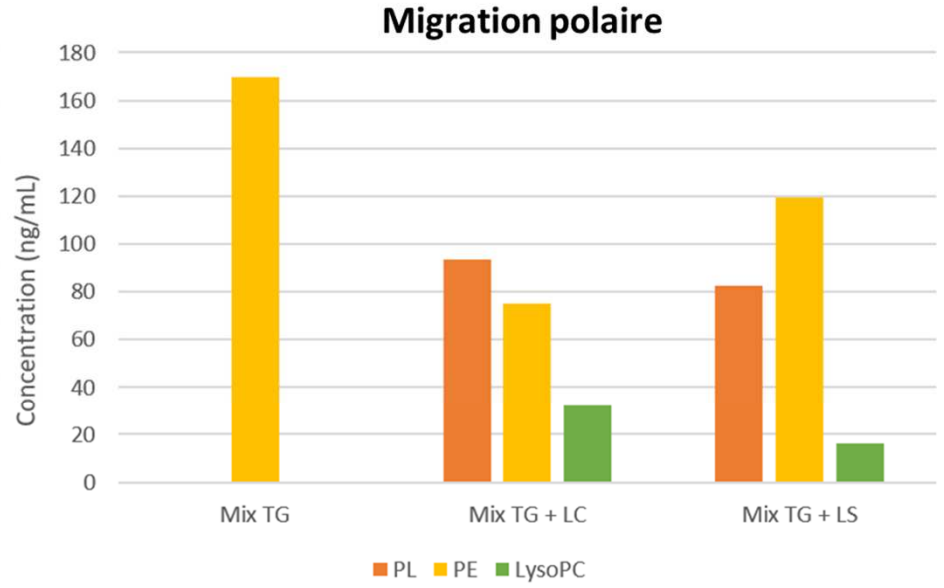
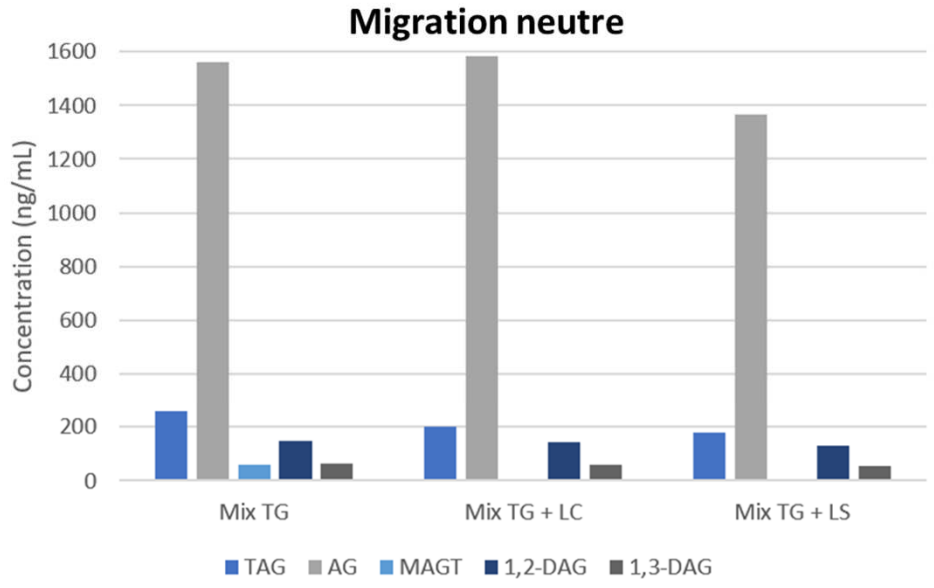
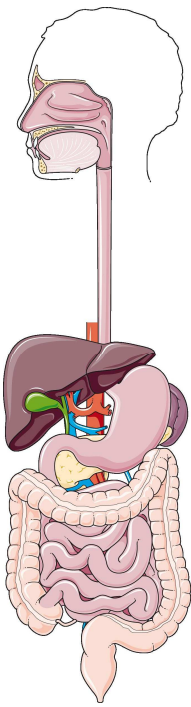
Migration
 chloroforme/méthanol/eau/ammoniaque (60/34/4/2)

Exemple d'application : suivi de la digestion *in vitro*



Exemple d'application : suivi de la digestion *in vitro*

Quantification des classes de lipides après digestion

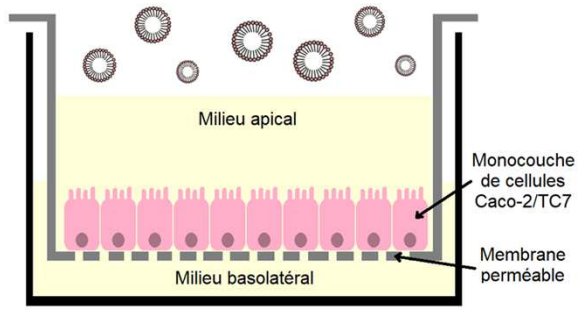


- Profils lipidiques **similaires**
- Taux de lipolyse = **78 %**
- **16 % et 7 % d'AG libérés** respectivement par les mix TG + LC et TG + LS

Exemple d'application : analyse des sphingolipides

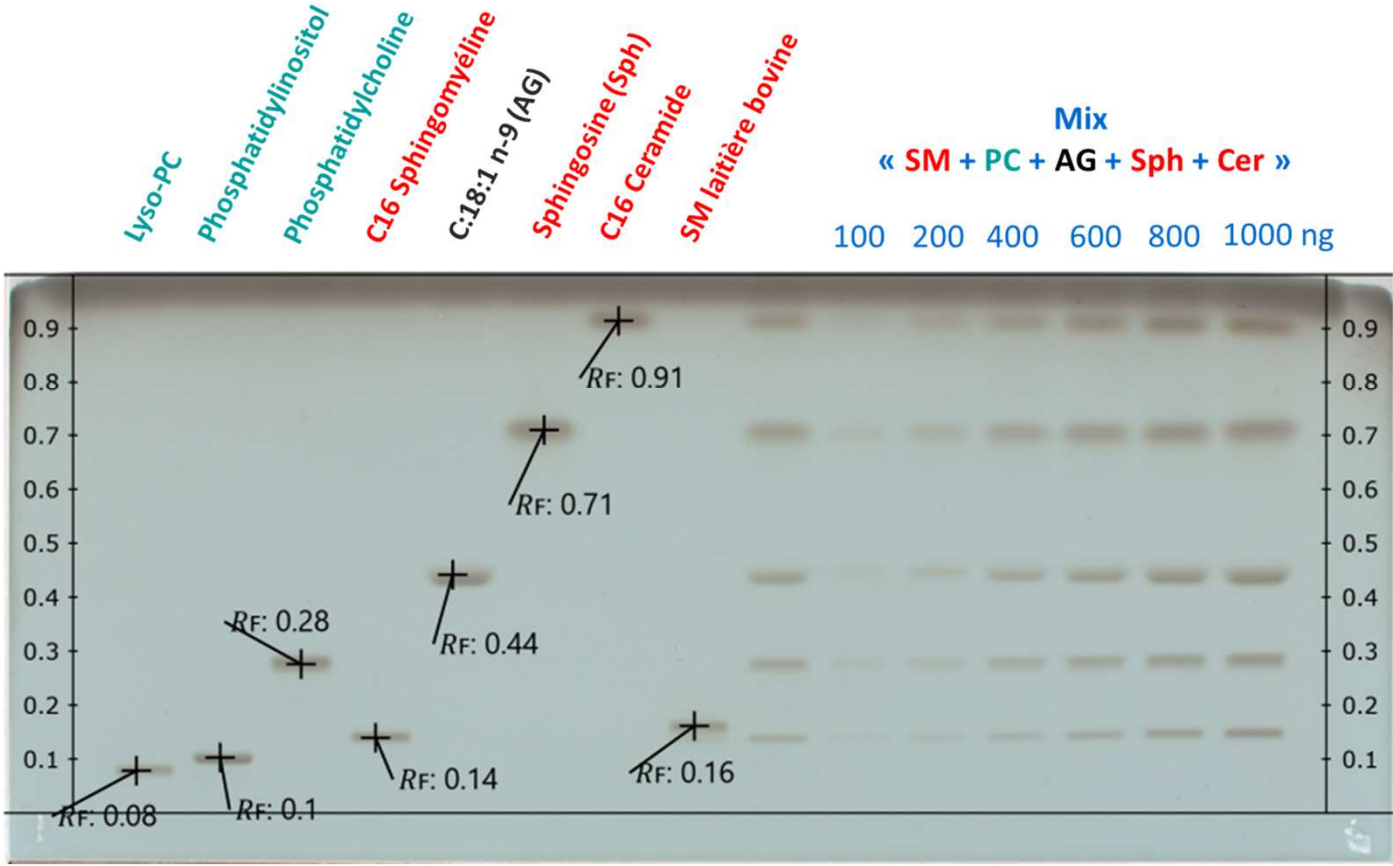
Incubations :

- Micelles postprandiales
- ± 400 µM sphingomyéline
- ± 50 µM sphingosine
- ± C23:0



Extraction lipidique :

- CHCl₃/MeOH (1:2)
- + standard interne : sphinganine (SPA)

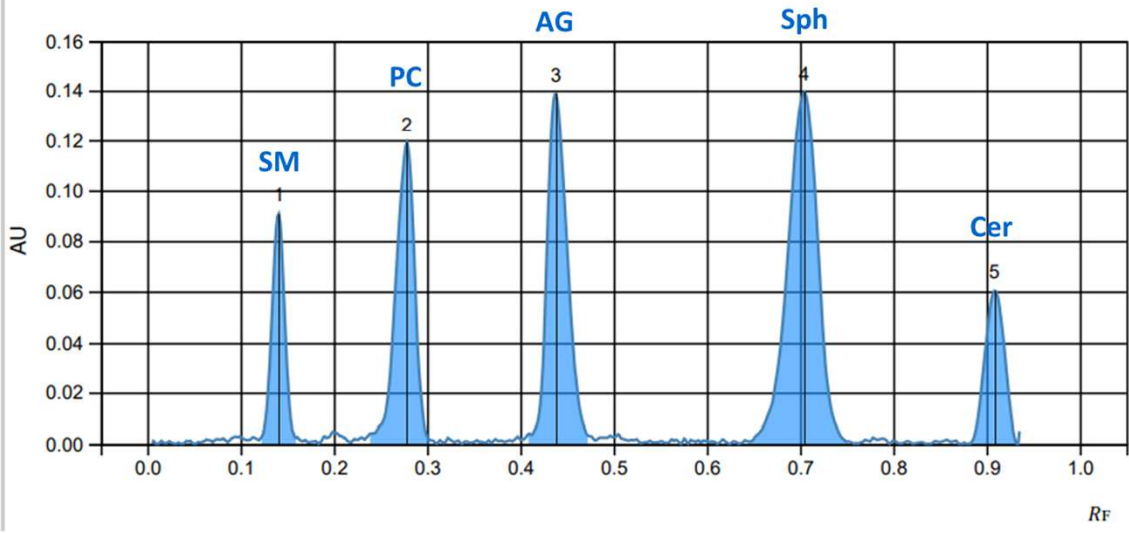


Solvant de migration : CHCl₃/MeOH/NH₄OH (65:25:4)
 Révélateur : 10 % CuSO₄ dans 8 % H₃PO₄ à 85 %
 Dépôt de standards externes

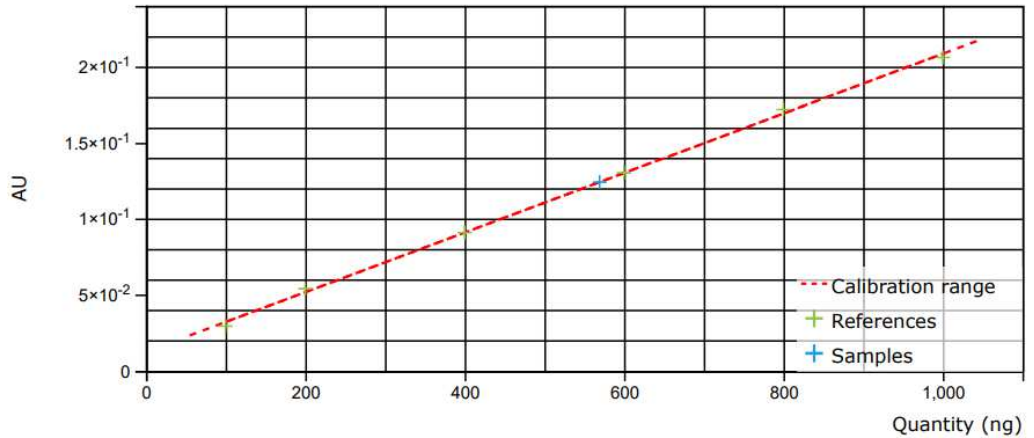
Exemple d'application : analyse des sphingolipides

Chromatogramme
 Mix « SM + PC + AG + Sph + Cer » (400 ng)

| | |
|-------------|----------------------------------|
| Type | Reference |
| Vial ID | CC-R-PC0009 |
| Description | MIX PC-C16SM-FA-SPH-C16Cer 400ng |
| Volume | 2.0 µl |



Courbe d'étalonnage des sphingomyélines

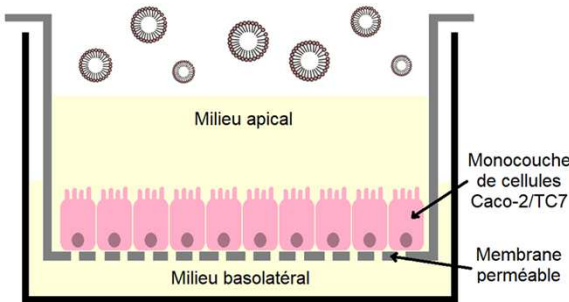


| | |
|--------------------------|--|
| Regression mode | Linear-2 |
| Range deviation | 5.00 % |
| Related substances | Default |
| Number of references | 6 |
| Calibration function | $y = 1.962 \times 10^{-7}x + 1.227 \times 10^{-2}$ |
| Coefficient of variation | CV 1.84 % |
| Correlation coefficient | R=0.999441 |

Exemple d'application : analyse des sphingolipides

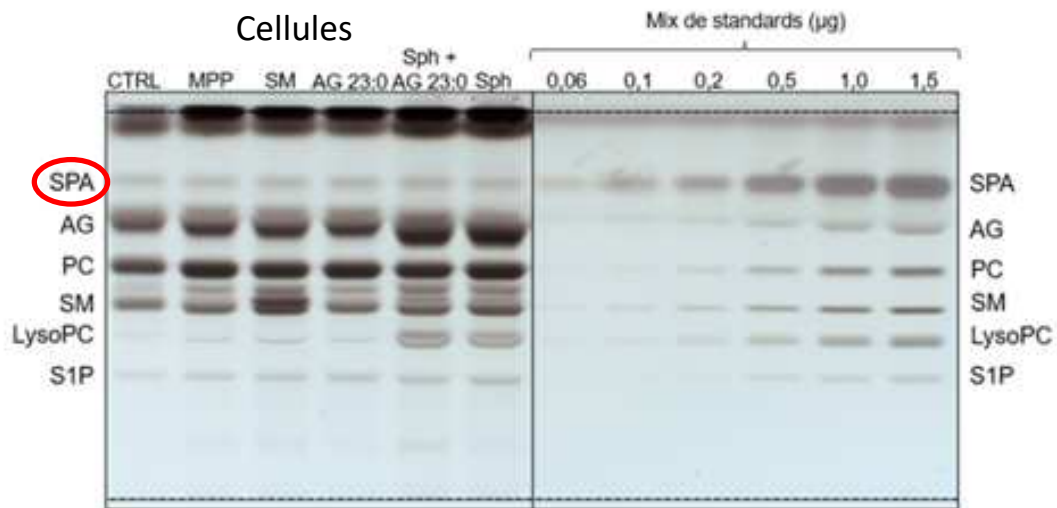
Incubations :

- Micelles postprandiales
- ± 400 µM sphingomyéline
- ± 50 µM sphingosine
- ± C23:0

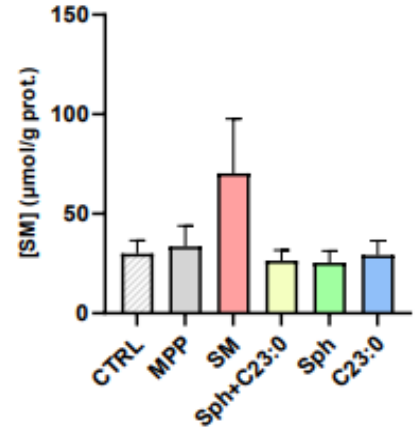


Extraction lipidique :

- CHCl₃/MeOH (1:2)
- + standard interne : sphinganine (SPA)

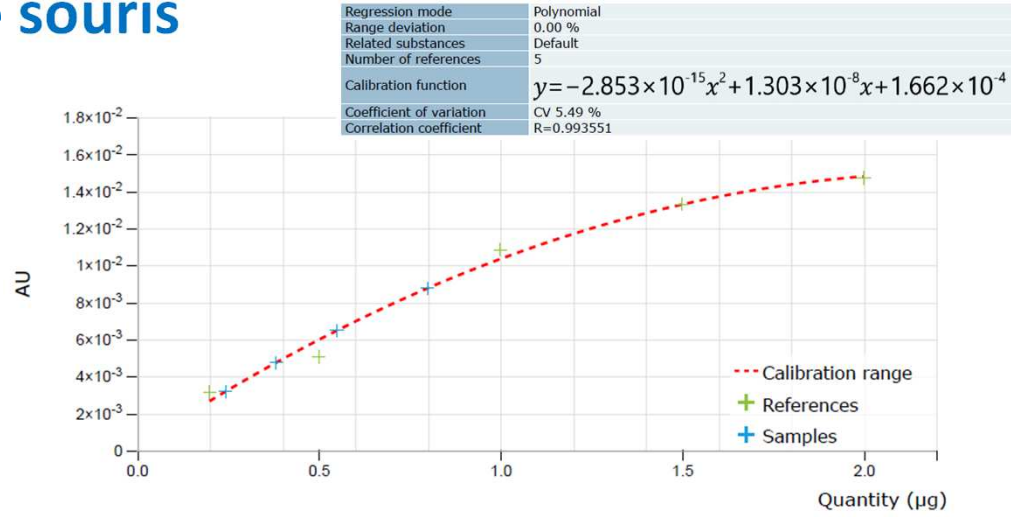


Solvant de migration : CHCl₃/MeOH/4,2N NH₄OH (9:7:2)
 Révélateur : 10 % CuSO₄ dans 8 % H₃PO₄ 85 %

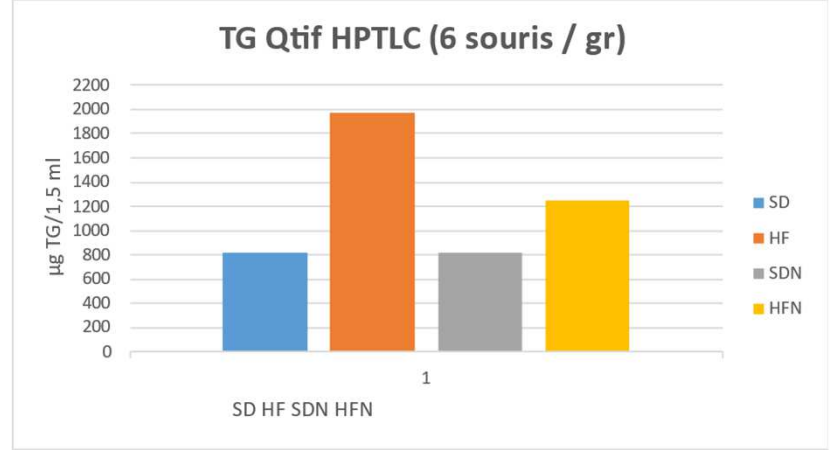
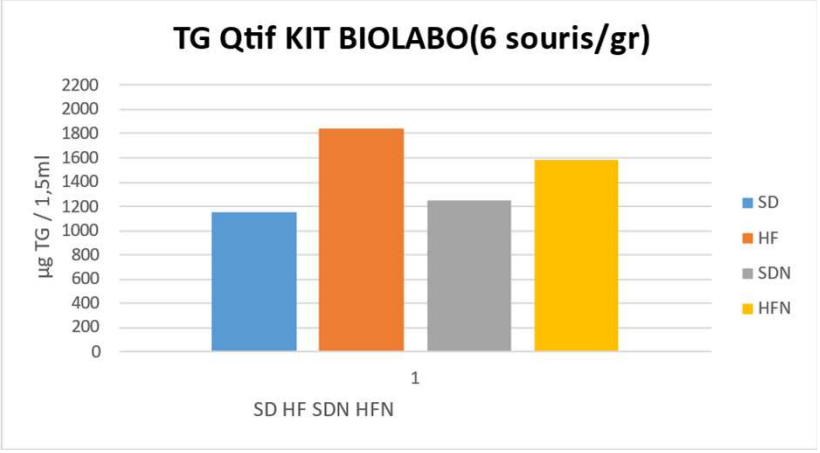


Sphingomyéline (cellules)

Exemple d'application : analyses de foies de souris

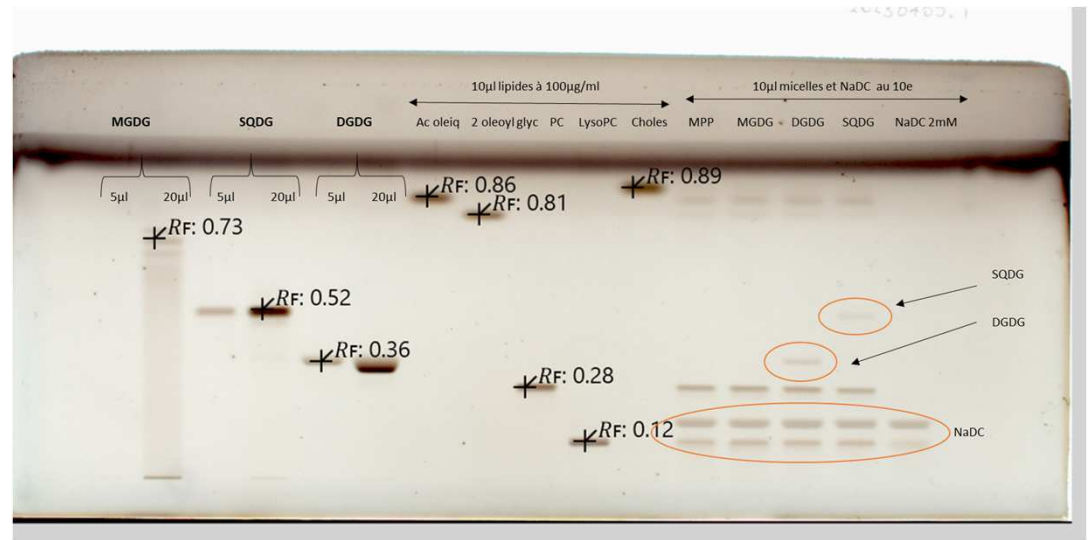


Comparaison des quantifications réalisées en KIT TG BIOLABO et en HPTLC sur 24 foies de souris



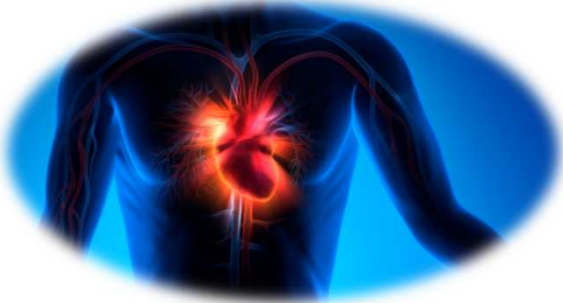
Exemple d'application : analyse des galactolipides

monogalactosyldiacylglycérol (**MGDG**)
digalactosyldiacylglycérol (**DGDG**)
sulfoquinovosyldiacylglycérol (**SQDG**)



Exemple d'application : les oléogels comme substituts de graisses solides

Acides gras *trans* / saturés



| Les acides gras trans naturels | | | Les acides gras trans industriels | | |
|--------------------------------|--|----------------|-----------------------------------|--|---------------|
| Bouurre | | 28,15 24,04 | Viennoiseries | | 8,63 10,38 |
| Fromage | | 17,75 10,05 | Pizzas | | 4,54 3,98 |
| Viande | | 9,18 8,97 | Pâtisseries | | 4,10 6,32 |
| Lait | | 8,06 3,80 | Biscuits | | 3,67 6,75 |
| Poisson | | 0,91 0,75 | Margarine | | 2,79 2,23 |
| Fruits secs | | 0,01 0,01 | Sauces | | 2 1,38 |

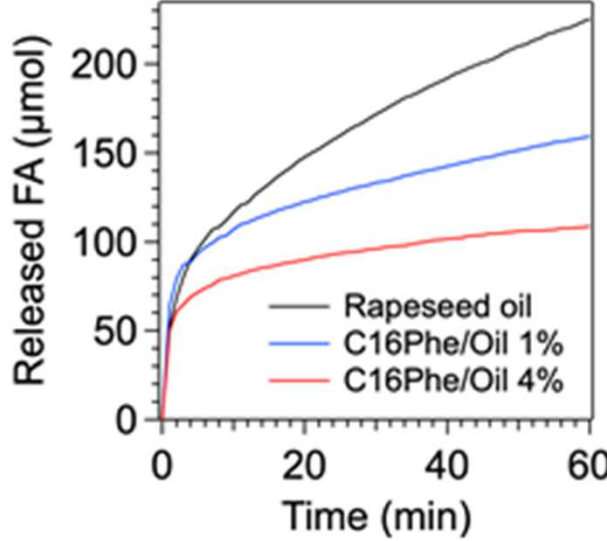


Huile de palme

Impact des oléogels sur la digestion, le métabolisme et le microbiote intestinal



Validation de la preuve de concept



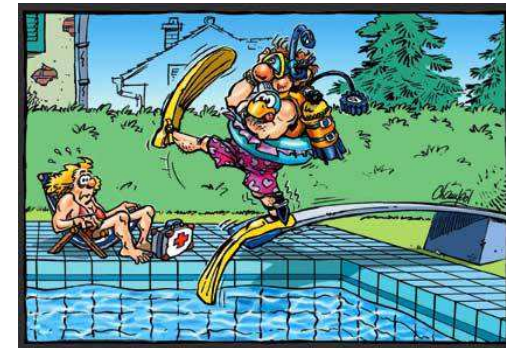
sanofi

estbb^{UCLy}
École d'Ingénieurs en Biotechnologies



Comment l'HPTLC constitue un bon outil d'investigation pour nos recherches dans le domaine de la nutrition ?

→ Un outil de recherche exploratoire, rapide et à coût réduit, facilement disponible



INSA INSTITUT NATIONAL
DES SCIENCES
APPLIQUÉES
LYON



INRAE

Inserm



CRNH
CENTRE DE RECHERCHE
EN NUTRITION RHÔNE-ALPES

sanofi

estbb^{Ucl}
École d'Ingénieurs en Biotechnologies

Merci pour votre attention



CRNH
CENTRE DE RECHERCHE
EN NUTRITION HUMAINE
RHÔNE-ALPES

Inserm

INRAE

INSA INSTITUT NATIONAL
DES SCIENCES
APPLIQUÉES
LYON



Merci à nos collègues CarMeN et CRNH
et nos partenaires

