

Description du projet de recherche

Biomarqueurs par RMN ^{13}C isotopomique positionnelle d'acides gras pour l'élucidation de voies métaboliques et pour les applications alimentaires et médicales

Les triacylglycérols sont des composés quasi universels qui se trouvent dans la plupart des matrices biologiques animales et végétales. Il s'agit d'une famille de molécules très diversifiées du fait de la complexité des réactions enzymatiques qui contribuent à leur formation. Cette complexité se reflète dans la longueur des chaînes acyles et dans leurs ramifications ; dans le nombre, la position et la géométrie des insaturations de ces chaînes ; dans la combinaison et la position des trois groupes acyles sur les trois sites du motif glycérol. Toutes ces manifestations métaboliques sont accompagnées de fractionnements isotopiques qui affectent le contenu en isotopes lourds ^2H et ^{13}C des positions spécifiques des triacylglycérols. Au cours des études précédentes, nous avons pu mettre en évidence cette dépendance entre les biomarqueurs métabolomiques et isotopiques. Ceci a notamment permis de montrer que les biomarqueurs métabolomiques relatifs à la composition des triacylglycérols en acides gras ainsi que les biomarqueurs isotopiques ^{13}C du cholestérol permettent séparément de distinguer les mêmes échantillons d'œuf en fonction de leur origine, de l'espèce des poules ou du système d'élevage [1, 2]. A titre d'exemple, la Figure 1 montre qu'une variable (obtenue par RMN ^1H) relative à la position des acides gras saturés sur le glycérol permet de distinguer des œufs en fonction de l'espèce des poules (l'espèce est reflétée par la couleur de l'œuf) [1]. Alors que la Figure 2 montre que des variables isotopiques ^{13}C relatives à différentes positions au sein de la molécule du cholestérol permettent la même discrimination des échantillons que la variable métabolomique à la Figure 1 [2].

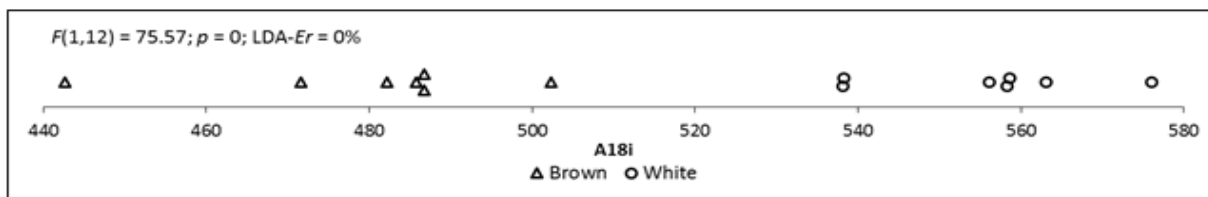


Figure 1

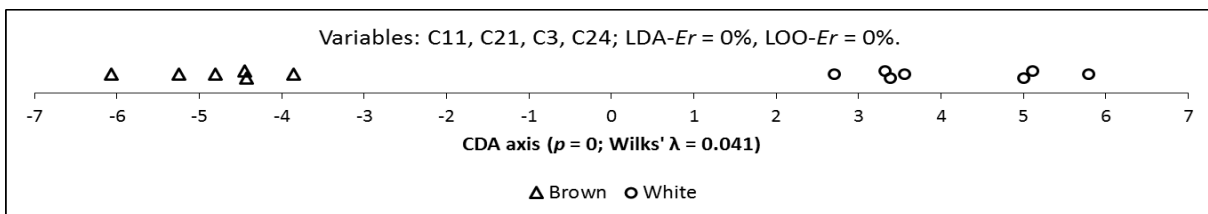
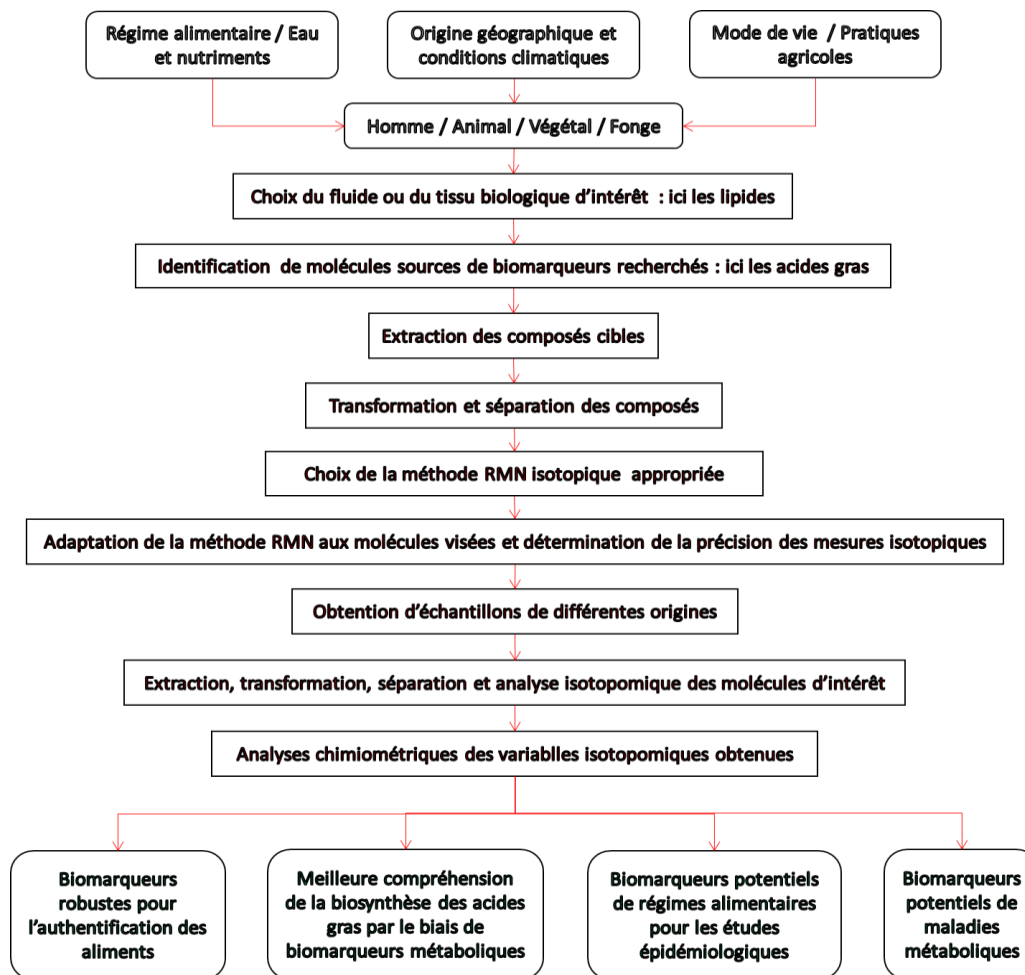


Figure 2

Les variables isotopiques positionnelles sont des biomarqueurs très efficaces qui permettent de remonter aux origines et conditions qui ont affecté l'élaboration d'une matrice biologique ou alimentaire. Ce type de biomarqueurs est très fiable bien que très peu exploité jusqu'à maintenant. Dans le présent projet, nous visons à développer des méthodes efficaces et rapides pour explorer le contenu isotopique ^{13}C positionnel des acides gras individuels qui entrent dans la composition des triacylglycérols. C'est une approche innovante et exclusive. Des matrices biologiques d'origines végétales et animales seront considérées afin d'identifier des biomarqueurs isotopiques capables de les distinguer en fonction de leur provenance et en fonction des métabolismes qui les caractérisent. Des applications dans le domaine médical et alimentaire sont en perspective. De même, les variables isotopiques qui seront déterminées serviront à améliorer la compréhension des schémas et des mécanismes de biosynthèse des acides gras.

La méthodologie qui sera suivie pour la réalisation du projet est décrite dans le diagramme de flux suivant :



Un savoir-faire en extraction et fractionnement des lipides dans les matrices alimentaires a été acquis lors de nos précédents travaux [1-4]. A cet égard, des méthodes efficaces et pratiques utilisant des solvants relativement non-toxiques et peu chers ont été développées et utilisées au sein de nos équipes [1-4]. De même, une méthode RMN ^{13}C avec transfert de polarisation [5] et une méthode RMN 2D ^1H - ^{13}C [3] qui permettent d'atteindre rapidement une précision de l'ordre du pour mille, requise pour l'analyse isotopique ^{13}C , ont été mises au point. Ces méthodes constituent l'infrastructure du présent projet du fait de leur efficacité dans le cas des molécules relativement grandes.

Les étapes à entreprendre dans ce projet consistent à :

- I. développer des méthodes préparatives, relativement rapides et quantitatives pour la séparation des acides gras des triacylglycérols ;
- II. adapter les méthodes RMN isotopiques robustes et rapides développées auparavant à l'analyse d'acides gras individuels de courtes, de moyennes et de longues chaînes, saturés et insaturés ;
- III. appliquer les méthodes isotopomiques développées sur des échantillons de différentes origines ;
- IV. effectuer des analyses statistiques univariées et multivariées pour les motifs cités dans les points qui suivent ;
- V. élucider ou confirmer les voies métaboliques relatives aux élongations et désaturations des acides gras ;
- VI. élucider les variations métaboliques liées à l'espèce végétale ou animale ;
- VII. élucider les variations métaboliques liées aux facteurs extrinsèques tels que les conditions géoclimatiques et les pratiques agricoles adoptées ;
- VIII. découvrir des biomarqueurs isotopiques fiables pour :
 - a. les apports alimentaires dans le cas des matrices d'origine animale,
 - b. l'authentification des aliments et la détection des fraudes relatives à leurs origines géographique botanique ou animale ainsi qu'aux systèmes agricoles déclarés,
 - c. la détermination quantitative des régimes alimentaires humains, ce qui est un défi dans la compréhension des épidémiologies nutritionnelles,

d. les maladies métaboliques et surtout cardiométaboliques.

Les travaux seront répartis selon le calendrier suivant :

Période	Université	Travaux
1 ^{er} septembre 2021 - 31 décembre 2021	Université Saint-Joseph	Etude bibliographique Développement d'une méthode préparative pour obtenir quantitativement des acides gras individuels à partir des triacylglycérols
1 ^{er} janvier 2022 - 30 juin 2022	Université de Nantes	Finalisation de la méthode de séparation des acides gras individuels Adaptation des méthodes RMN isotopiques à l'analyse des acides gras de courtes chaînes Préparation d'échantillons de différentes origines et analyse des acides gras de courtes chaînes par RMN et irmMS
1 ^{er} juillet 2022 - 15 septembre 2022	Université Saint-Joseph	Détermination de la répétabilité et de la reproductibilité des méthodes Traitement des spectres RMN des échantillons analysés et quantification des isotopomères ¹³ C des acides gras Préparation d'échantillons de différentes origines
16 septembre 2022 - 15 mars 2023	Université de Nantes	Adaptation des méthodes RMN isotopiques à l'analyse des acides gras de moyennes et longues chaînes Préparation d'échantillons de différentes origines et analyse des acides gras de courtes, moyennes et longues chaînes par RMN et irmMS
16 mars 2023 - 31 août 2023	Université Saint-Joseph	Traitement des spectres RMN des échantillons analysés et quantification des isotopomères ¹³ C des acides gras Analyses statistiques univariées et multivariées pour révéler les corrélations isotopiques intramoléculaires et intermoléculaires au niveau des acides gras et pour créer des modèles de classification des échantillons Adaptation des techniques de préparation d'échantillons aux tissus adipeux Interprétation des résultats et rédaction d'articles correspondants
1 ^{er} septembre 2023 - 29 février 2024	Université de Nantes	Analyse d'échantillons de différentes origines par GC, RMN et irmMS. Traitement des spectres RMN des échantillons analysés
1 ^{er} mars 2024 - 31 août 2024	Université Saint-Joseph	Analyses statistiques uni- et multivariées pour élucider les mécanismes de biosynthèse des acides gras, pour identifier des biomarqueurs de régimes alimentaires et pour créer des modèles de classification des échantillons Interprétation des résultats et rédaction d'articles correspondants Rédaction du manuscrit de thèse

Références:

- [1] G. Hajjar, L. Haddad, T. Rizk, S. Akoka, and J. Bejjani. High-resolution ¹H NMR profiling of triacylglycerols as a tool for authentication of food from animal origin: Application to hen egg matrix. Article submitted to *Food Chemistry* on March 3, 2021.
- [2] G. Hajjar, T. Rizk, S. Akoka, and J. Bejjani (2019). Cholesterol, a powerful ¹³C isotopic biomarker. *Analytica Chimica Acta*, 1089, 155-122.
- [3] L. Haddad, S. Renou, G. S. Remaud, T. Rizk, J. Bejjani, and S. Akoka (2021). A precise and rapid isotopic analysis of small quantities of cholesterol at natural abundance by optimized ¹H-¹³C 2D NMR. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413, 1521-1532.
- [4] G. Hajjar, T. Rizk, J. Bejjani, and S. Akoka (2020). Metabisotopomics of triacylglycerols from animal origin: A simultaneous metabolomic and isotopic profiling using ¹³C INEPT. *Food Chemistry*, 315, 126325.
- [5] N. Merchak, J. Bejjani, T. Rizk, V. Silvestre, G. S. Remaud, and S. Akoka (2015). ¹³C isotopomics of triacylglycerols using NMR with polarization transfer techniques. *Analytical Methods*, 7, 4889-4891.