

## Comment doser les marqueurs de la peroxydation des omégas 3 et 6 par CPG-SM/SM dans différentes matrices ? Intérêt du profil d'exactitude dans cette démarche

Céline Chantelauze<sup>1</sup>, Charlotte Joly<sup>2,3</sup>, Mylène Delosière<sup>4</sup>, Blandine Comte<sup>3</sup>, Océane Martin<sup>5,6</sup>, Fabrice Pierre<sup>5</sup>, Nathalie Naud<sup>5</sup>, Claire Dufour<sup>7,8</sup>, Estelle Pujos-Guillot<sup>2,3</sup>,  
Agnès Thomas<sup>1</sup>, Denys Durand<sup>1</sup>

**Résumé.** Les acides gras polyinsaturés (AGPI) de type n-6 et n-3 sont connus pour leurs propriétés bénéfiques pour l'Homme. Mais ces composés sont également très sensibles à la peroxydation. Les produits terminaux de la lipoperoxydation sont le 4-hydroxy-2-nonéanal (HNE) et le 4-hydroxy-2-hexéanal (HHE) respectivement. Ces composés sont très réactifs ce qui leur permet de moduler l'expression génique en se fixant sur des protéines ou directement sur l'ADN. Par contre, ils peuvent aussi s'avérer cytotoxiques lorsqu'ils sont produits en excès. Ils existent sous deux formes, une forme libre et une forme liée notamment à des protéines. Nous avons mis au point une méthode d'extraction conjointe du HNE et du HHE sous leurs deux formes pour leur quantification par CPG-SM/SM. Nous avons également proposé différentes adaptations de la méthode en fonction des matrices testées. Enfin, certaines performances des méthodes proposées ont été évaluées par l'approche du profil d'exactitude.

**Mots clés :** hydroxyalkénals, HNE, HHE, HNE-P, HHE-P, AGPI n-3, AGPI n-6, lipoperoxydation, profil d'exactitude

### Introduction

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) de type n-6 et n-3, plus communément appelés omégas 6 et 3, sont connus pour leurs propriétés bénéfiques pour l'Homme. Ces AGPI sont essentiels au bon fonctionnement de l'organisme. Les précurseurs à chaîne courte (acides linoléique et alpha-linolénique) sont également dits « indispensables » du fait que l'Homme ne peut pas les synthétiser et qu'ils doivent être apportés par l'alimentation. Récemment le DHA (DocosaHexaenoic Acid) a aussi été reconnu comme étant indispensable (rapport de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail - ANSES -2011). Si les apports globaux en AGPI restent insuffisants, c'est surtout le déficit en AGPI n-3 qui pose problème ; en effet, les recommandations actuelles préconisent un équilibre n-6 / n-3 inférieur à 5 alors qu'il est voisin de 10 (Legrand et al., 2002). Pour ce faire, différentes stratégies ont été proposées pour augmenter les apports en AGPI n-3 aux consommateurs ; en particulier en supplémentant les rations des animaux de rente avec des oléagineux riches en n-3 (comme la graine de lin ou de colza) permettant ainsi d'augmenter la qualité nutritionnelle de leurs produits (viande, lait) (Bauchart et al., 2005). Mais ces AGPI sont très sensibles à la peroxydation (ou oxydation non-enzymatique) aussi bien au niveau plasmatique (Scislowski et al., 2005) que tissulaire (Durand et al., 2005). Les produits

<sup>1</sup> INRA, UMRH1213 Unité mixte de recherches sur les herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France ;  
[celine.chantelauze@clermont.inra.fr](mailto:celine.chantelauze@clermont.inra.fr)

<sup>2</sup> INRA, UMR1019 Plateforme d'exploration du métabolisme, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

<sup>3</sup> INRA, UMR1019 Unité de nutrition humaine, F-63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>4</sup> INRA, UR370 Qualité des produits animaux, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

<sup>5</sup> INRA, UMR1331 ToxAlim, F-31027 Toulouse Cedex 3, France

<sup>6</sup> ADIV Association, 10 rue Jacqueline Auriol, F-63039 Clermont-Ferrand, France

<sup>7</sup> INRA, UMR408 Sécurité et qualité des produits d'origine végétale, F-84000 Avignon, France

<sup>8</sup> Université d'Avignon, UMR408 Sécurité et qualité des produits d'origine végétale, F-84000 Avignon, France

**C. Chantelauze, C. Joly, M. Delosière, B. Comte, O. Martin, F. Pierre, N. Naud, C. Dufour, E. Pujos-Guillot, A. Thomas, D. Durand**

terminaux de la lipoperoxydation s'avèrent néfastes pour la santé de l'animal et capables d'altérer les qualités nutritionnelles et sensorielles de leurs produits (Aurousseau., 2002).

Le 4-hydroxy-2-nonéanal (HNE) et le 4-hydroxy-2-hexéanal (HHE) sont les produits terminaux spécifiques de la peroxydation des AGPI n-6 et n-3 respectivement (Lesgards et al., 2009). Depuis plusieurs années, le développement des méthodes analytiques a permis d'identifier ces composés qui existent sous deux formes. On les trouve sous forme libre, mais cette forme est hautement réactive et peut se lier très rapidement avec des molécules nucléophiles comme les protéines, les lipides et l'ADN pour former des adduits (Esterbauer et al., 1991). La liaison du HNE ou du HHE à une protéine s'effectue préférentiellement avec le groupement thiol (-SH) d'une cystéine, la fonctionnalité de la protéine peut alors être modifiée. A titre d'exemple, il a été montré que le HHE à faible dose pouvait induire l'expression de l'hème oxygénase-1 (HO-1) dans des cellules endothéliales en culture (Ishikado et al., 2010). Toutefois, ces composés lorsqu'ils sont en excès, sont également soupçonnés d'être promoteurs du cancer colorectal et d'expliquer au moins en partie l'effet promoteur des viandes rouges et charcuteries récemment souligné par l'OMS (Bouvard et al., 2015). En effet, leur incorporation en grande quantité au sein de cellules saines entraîne une mort cellulaire et les cellules précancéreuses (mutées sur le gène *Apc*) ont une plus grande capacité à éliminer le HNE ; d'où une survie sélective de ces cellules précancéreuses au détriment des cellules saines (Pierre et al., 2006 ; Surya et al., 2015<sup>6</sup>). Le suivi de ces composés dans l'aliment et tout au long du tractus digestif (dans des contenus gastriques, intestinaux ou encore dans les fèces) doit permettre d'obtenir des informations précieuses sur l'exposition des cellules du tractus digestif à ces composés. Jusqu'à aujourd'hui, la mesure simultanée des quatre composés : HNE, HHE respectivement sous leurs deux formes libre et liée aux protéines n'a jamais été réalisée.

Notre travail a porté sur la mise au point et la validation d'une **méthode d'extraction conjointe du HNE et du HHE sous leurs deux formes (libre et liée aux protéines) pour leur quantification par CPG-SM/SM au sein de différentes matrices alimentaires et biologiques (viandes, digestas stomacaux, fèces).**

### **Mise au point de la méthode d'extraction du HNE et du HHE libres et du HNE-P et du HHE-P (liés aux protéines) à partir de la viande**

Nous nous sommes basés sur la méthode d'extraction décrite par Véronneau et al., (2002) sur du cœur et adaptée par Asselin et al., (2006) sur du sang et du plasma. Différentes adaptations ont été apportées pour la matrice "viande" (muscle, muscle maturé ou viande crue, viande cuite).

#### **Préparation de la matrice**

A la différence du sang, la matrice viande est plus complexe et comme pour le cœur nécessite préalablement une étape d'homogénéisation par broyage. La technique préparative choisie a été le broyage sous azote liquide, garantissant l'obtention d'une poudre homogène et surtout permettant de prévenir tout processus d'oxydation habituellement inévitable à température ambiante. Le fait que la viande ne soit absolument pas décongelée au cours de cette étape est essentiel à ce dosage des produits issus de la peroxydation.

#### **Réduction des composés HNE et HHE libres et HNE-P et HHE-P en alcools primaires**

Cent milligrammes de poudre de viande sont homogénéisés en présence d'un tampon à pH 7,1 contenant BHT / Hépès / EDTA (0,9 mM / 39 mM / 0,4 mM). Le BHT bloque l'oxydation qui pourrait être générée au cours de l'homogénéisation. Deux cent microlitres de NaBD<sub>4</sub> (1,13 M) permettent de réduire les HNE et HHE libres et liés aux protéines et de les stabiliser sous forme d'alcools primaires. Cette réduction est réalisée durant 30 min sur glace. Les HNE-P et HHE-P deviennent alors respectivement des 1,4-dihydroxynonène (D-DHN-P) et 1,4-dihydroxyhexène (D-DHH-P) liés aux protéines et les HNE et HHE libres deviennent alors respectivement

---

<sup>6</sup> Soumis pour publication au journal Carcinogenesis, septembre 2015.

des 1,4-dihydroxynonène (D-DHN) et 1,4-dihydroxyhexène (D-DHH) libres. L'utilisation du NaBD<sub>4</sub> portant un noyau deutéré nous permet de différencier les composés DHN et DHH endogènes (présents naturellement à l'état « basal » dans la matrice), de ceux provenant des HNE et HHE que l'on souhaite mesurer. Cette différenciation se fera par la mesure de la masse de ces composés en spectrométrie de masse.

### Séparation des formes libres et des formes liées aux protéines

L'étape suivante permet la séparation des deux différentes formes des D-DHN et D-DHH libres et liées aux protéines. Le complexe hydroxyalkénal-protéine est précipité par une solution aqueuse d'acide sulfosalicylique saturée durant 30 min sur glace. Les formes libres restent en suspension dans le broyat. Les deux différentes formes sont alors séparées par centrifugation (5000 g pendant 10 min à 4°C), les formes liées aux protéines se retrouvant dans le culot et les formes libres dans le surnageant. Pour extraire les formes liées, le culot est repris dans un tampon à pH 7,1 contenant Guanidine / Tris / EDTA (8 M / 133 mM / 13 mM). La solubilisation des formes liées aux protéines est améliorée par une étape de sonification (trois fois 6 s). Nous pouvons ensuite soit conserver les formes libres dans le surnageant de broyat congelé à -80°C pour l'extraire ultérieurement, soit poursuivre les étapes d'extraction décrites ci-après sur les deux différentes formes en parallèle.

### Ajout du standard interne

Une quantité connue de dihydroxynonène marqué (D<sub>11</sub>-DHN) (0,25 nmol) est ajoutée à la suspension (contenant les formes liées aux protéines) et au surnageant (contenant les formes libres) ; cette molécule est notre standard interne. Ce dernier présente une masse et un temps de rétention différents de ceux de nos composés d'intérêt du fait de la présence de 11 deutériums.

### Hydrolyse

Les échantillons sont incubés 15 h à 55°C en présence de Nickel de Raney, sous agitation et sous atmosphère azotée. Cette étape permet l'hydrolyse des liaisons carbone-soufre avec les protéines pour les composés D-DHN-P et D-DHH-P et la réduction des doubles liaisons carbone-carbone pour les composés D-DHN et D-DHH.

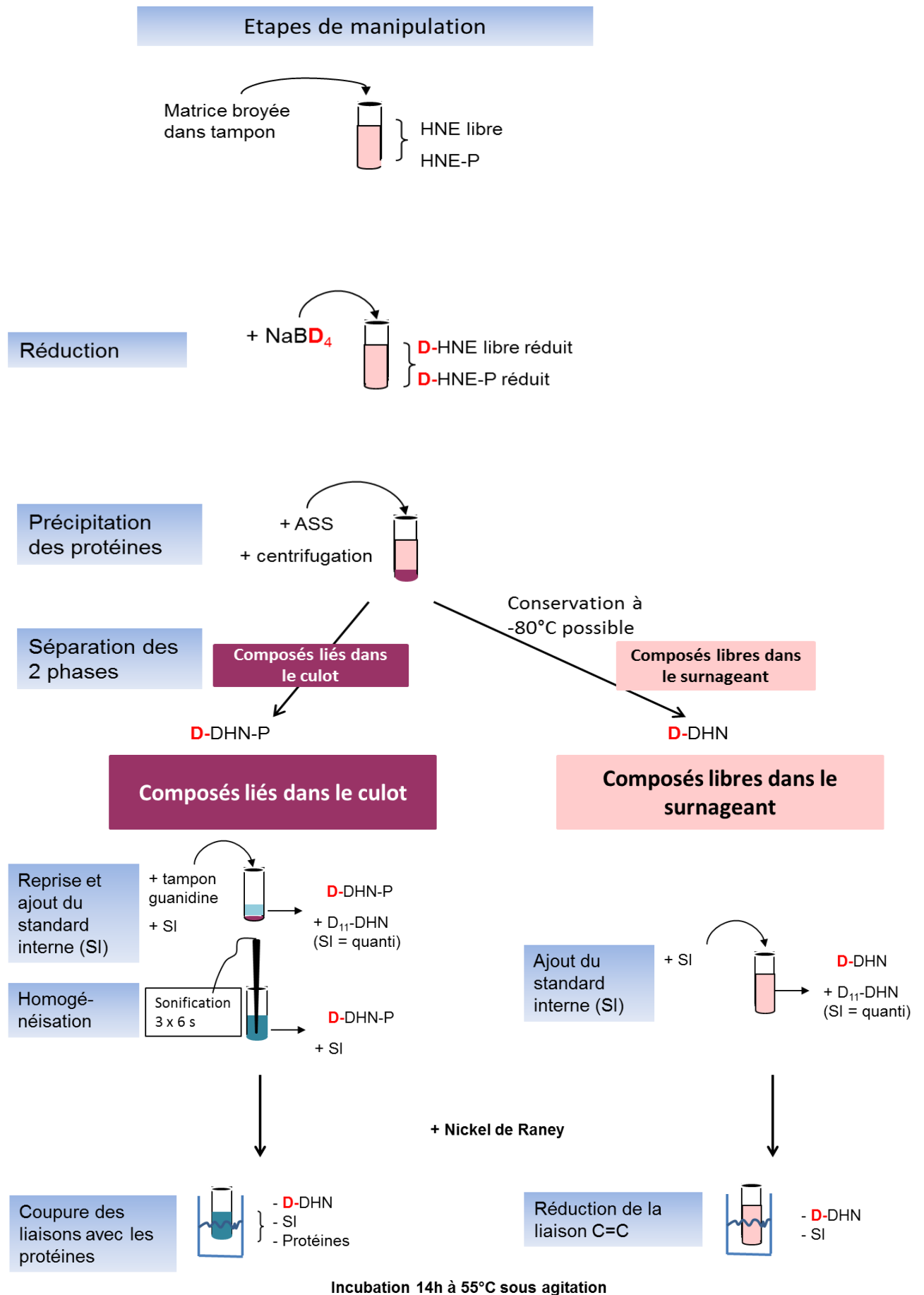
### Purification, séchage et dérivation

L'hydrolyse est stoppée par refroidissement brutal dans la glace et le Nickel de Raney est précipité par centrifugation à 2000 g à 20°C pendant 5 min. Les surnageants sont acidifiés par l'ajout de quelques gouttes d'HCl 12 N, puis leur densité est augmentée par ajout de quelques grammes de NaCl.

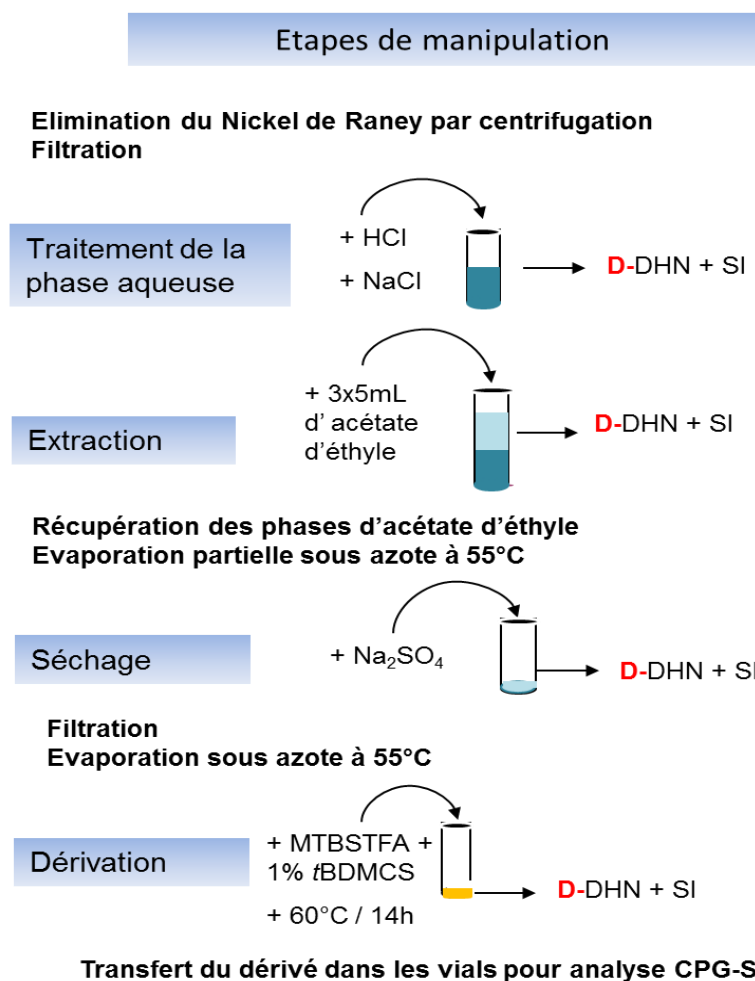
Les composés sont extraits avec 3 x 5 mL d'acétate d'éthyle qui sont ensuite évaporés sous flux d'azote conjointement à un chauffage au bain marie à 55°C jusqu'à obtenir une fraction concentrée d'environ 1 mL. Ces extraits sont ensuite séchés à l'aide de sulfate de sodium (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ajouté sous forme solide dans le but de favoriser le rendement de l'étape de dérivation/silylation qui est limitée par la présence d'eau. Une étape de filtration sur laine de verre est alors nécessaire pour éliminer le sulfate de sodium chargé de l'eau résiduelle. Les échantillons sont transférés dans des vials de CPG-SM/SM, évaporés sous flux d'azote et dérivés en adduits *tert*-butyldiméthylsilylés avec 50 µL de N-méthyl-N-*tert*-butyldiméthylsilyltrifluoroacétamide (MTBSTFA) + 1% de *tert*-butyldiméthylchlorosilane (*t*BDMCS) pendant 14 h à 60°C. La dérivation permet d'augmenter la masse et la volatilité des composés d'intérêt pour leur quantification en CPG-SM/SM triple quadripôle.

La **Figure 1** schématise les principales étapes de ce mode opératoire.

Le **Tableau 1** présente les formules moléculaires associées à ce mode opératoire pour le HNE.

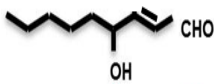
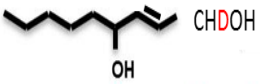
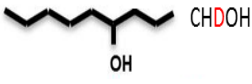
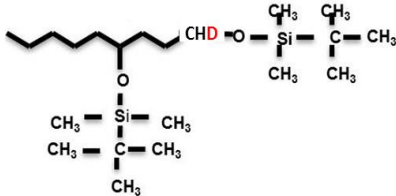
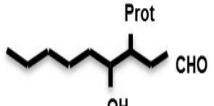
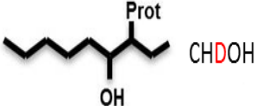


La suite de l'extraction est identique pour les deux fractions



**Figure 1.** Schéma des principales étapes de préparation des échantillons en vue de la quantification des composés HNE sous leur forme liée aux protéines (dans le culot) et libre (dans le surnageant).  
Ce schéma s'applique de la même manière au HHE.

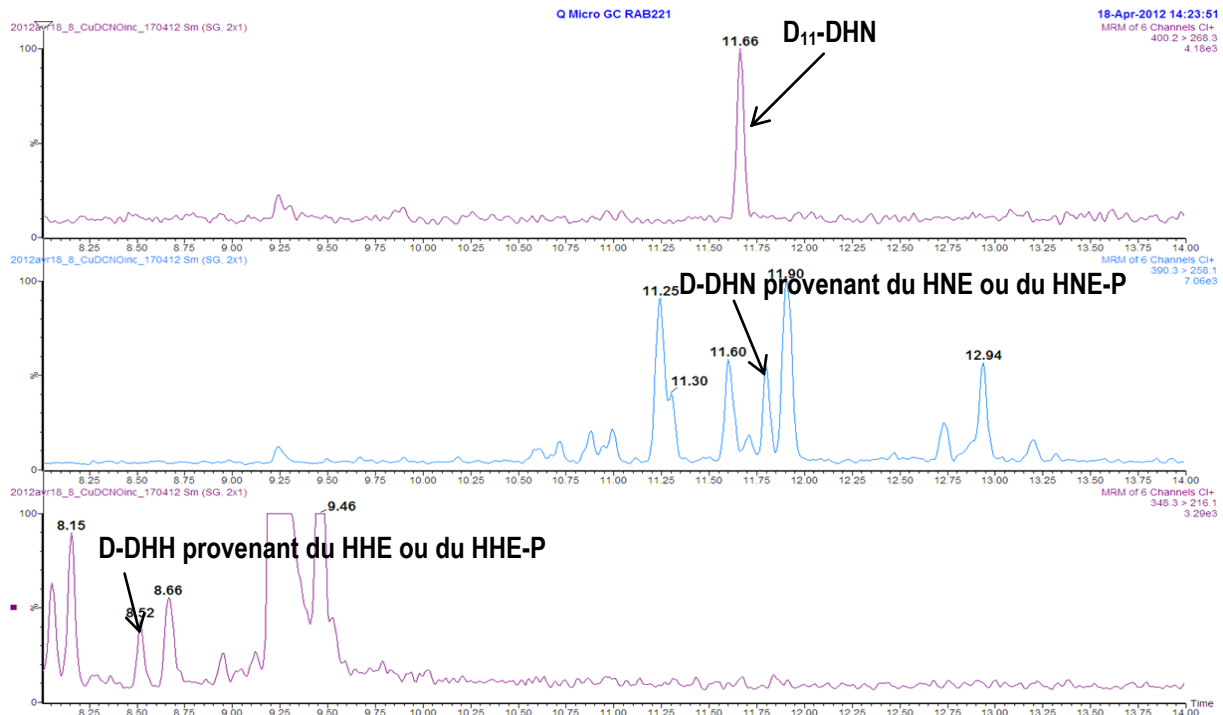
**Tableau 1.** Formules moléculaires associées au mode opératoire d'extraction des composés HNE libre et lié aux protéines. Les mêmes étapes ont lieu sur la molécule HHE.

Après lipoperoxydation	Après réduction au NaBD <sub>4</sub>	Après incubation en présence de Nickel de Raney	Après dérivation tBDMS
			
HNE libre	D-DHN libre		
			
HNE lié à une protéine	D-DHN lié à une protéine	D-DHN	D-DHN silylé

C. Chantelauze, C. Joly, M. Delosière, B. Comte, O. Martin, F. Pierre, N. Naud, C. Dufour, E. Pujos-Guillot, A. Thomas, D. Durand

Les extraits silylés sont prêts à être injectés en CPG-SM/SM selon les paramètres décrits par Gladine et al., (2012). La description de la méthode CPG-SM/SM sera rapportée dans l'article de Joly et al., en cours d'écriture pour le Cahier des Techniques de l'INRA.

Succinctement, la séparation est réalisée sur une colonne capillaire HP-5MS avec comme gaz vecteur l'hélium. Un spectromètre de masse triple quadripôle équipé d'une source d'ionisation chimique est utilisé. L'ionisation est effectuée en mode positif avec comme gaz d'ionisation l'isobutane. L'acquisition est réalisée en mode suivi de réaction (MRM). Les transitions de nos molécules d'intérêt sont  $m/z$  390,3  $\rightarrow$  258,1 pour le D-DHN (provenant du HNE ou du HNE-P),  $m/z$  348,3  $\rightarrow$  216,1 pour le D-DHH (provenant du HHE ou du HHE-P) et  $m/z$  400,3  $\rightarrow$  268,1 pour le D<sub>11</sub>-DHN (SI). Un exemple de chromatogramme obtenu est présenté sur la **Figure 2**.



**Figure 2.** Chromatogrammes extraits obtenus présentant nos deux composés d'intérêt marqués (D-DHN et D-DHH) et le standard interne (D<sub>11</sub>-DHN).

La quantification se fait par étalonnage externe grâce à une gamme étalon réalisée avec différentes concentrations de nos ions d'intérêt et analysée en même temps que nos échantillons.

Cette méthode a été appliquée à des viandes différentes par leur mode de conservation (sous-vide, sous-film, sous atmosphère modifiée). Les résultats ont permis de confirmer que la mesure des composés d'intérêt (HNE-P et HHE-P) était bien spécifique des différentes familles d'AGPI n-6 et n-3 ; et que leur quantité était très corrélée à un autre marqueur de la lipoperoxydation qu'est le malondialdéhyde (MDA) habituellement dosé (Gobert et al., 2010). Suite à ces résultats sur la viande, l'intérêt porté à ces molécules nous a rapidement conduits à travailler sur d'autres matrices dans le but d'appréhender leur devenir tout au long du tractus digestif.

## Adaptation de la méthode d'extraction développée sur la viande à d'autres matrices d'intérêt

Le premier point à vérifier face à toute nouvelle matrice faisant l'objet de ce dosage est de mesurer l'effet matrice. Si cet effet matrice est négligeable, il est d'usage de ne réaliser qu'une gamme étalon dans l'eau ou un solvant

organique pour plusieurs dosages. Pour tester l'effet matrice, nous avons réalisé un test de spécificité pour les composés HNE-P et HHE-P sur la matrice viande (sur laquelle nous avons acquis de l'expérience).

### Test de spécificité

Ce test est tiré de la norme NF V03-110 (1998). Pour ce test, nous réalisons le même jour deux gammes de mêmes concentrations : une gamme réalisée dans de l'eau et une gamme réalisée par ajouts dosés de l'analyte pur dans la matrice d'intérêt (viande). A partir de ces deux gammes, la droite de recouvrement est calculée (pente et écart-type de la pente).

Le test de spécificité consiste à tester si la pente de la droite de recouvrement est différente de 1 en calculant le  $t_{obs}$  qui suit une loi de Student, à l'aide de la formule :

Test de signification de la pente =  $t_{obs} = |(pente - 1)| / \text{écart-type de la pente}$ .

Pour que la spécificité soit acceptable, il faut que  $t_{obs}$  soit inférieur à la valeur critique lue dans la table de Student au risque de 1% (avec un minimum de 10 ajouts dosés). Les résultats obtenus sont reportés dans le **Tableau 2** ci-après.

**Tableau 2.** Résultats du test de spécificité

Composés d'intérêt	Pente de la droite de recouvrement	Ecart-type de la pente	$t_{obs}$	Valeur critique (pour 10 échantillons)	Conclusion
HNE-P	1,046	0,031	<b>1,456</b>	3,355	<b>Acceptable</b>
HHE-P	2,143	0,246	<b>4,652</b>	3,355	<b>NON Acceptable</b>

Notre méthode est donc spécifique pour le HNE-P ( $t_{obs} < \text{valeur critique}$ ), mais ne l'est pas pour le HHE-P. Nous pensons que ce résultat est peut-être dû au standard interne choisi qui est du DHN donc plus représentatif du HNE que du HHE. Nous n'avions toutefois pas en notre possession un standard interne de DHH, nous avons donc décidé de réaliser les droites d'étalonnage par ajouts dosés d'analyte pur au sein de chacune des matrices étudiées.

Suite à cette première série de mise au point sur la matrice viande, nous avons été sollicités par différentes équipes de recherche souhaitant quantifier ces mêmes molécules dans de nouvelles matrices d'intérêt pour leurs recherches. En particulier pour suivre le devenir de ces molécules tout au long du processus digestif suite à l'ingestion de viandes, comme par exemple dans des contenus gastriques (collaborations avec les Unités QuaPA et SQPOV) ou fécaux (collaboration avec l'Unité ToxAlim).

### Contenus gastriques

Dans le cadre du projet AIC Liprophen (2010-2011) porté par Claire Dufour (SQPOV, CEPIA), la stabilité de lipides alimentaires a été évaluée *in vivo* au cours de la digestion gastrique d'un repas de type occidental. L'étude a également porté sur la capacité de polyphénols végétaux à inhiber la lipoperoxydation lors de la digestion gastrique. Des mini porcs canulés au niveau de l'estomac ont reçu différents régimes à base de viande de bœuf cuite, d'huile végétale associée ou non à des fruits et des légumes ou des polyphénols purifiés. Le suivi cinétique des composés HNE-P et HHE-P s'est avéré très intéressant pour comprendre les phénomènes d'oxydation dans le tractus digestif haut. Les digestas stomacaux présentaient des statuts oxydatifs (évalués par la mesure de TBARS et des diènes conjugués dérivés des lipides, Gobert et al., 2014) très différents en fonction des repas consommés et des durées de transit dans l'estomac.



**C. Chantelauze, C. Joly, M. Delosière, B. Comte, O. Martin, F. Pierre, N. Naud, C. Dufour, E. Pujos-Guillot, A. Thomas, D. Durand**

Les contenus gastriques constituent une matrice particulièrement riche en divers composés protéiques et polysaccharidiques provenant des repas consommés. Par ailleurs, nous avons dû adapter les prises d'essai aux faibles concentrations de nos molécules d'intérêt dans l'estomac. Nous avons déterminé la prise d'essai optimale, soit 500 mg de digesta, permettant d'avoir, à la fois des concentrations adaptées à notre domaine de validité, mais aussi un rapport signal sur bruit optimal. Cependant nous avons dû introduire des étapes de filtrations supplémentaires après l'hydrolyse au Nickel de Raney. Ainsi, les digestas étaient purifiés d'abord sur laine de verre puis sur filtres 0,44 µm. Ces étapes de filtration sont essentielles à l'obtention d'un signal correct en CPG-SM/SM. Les résultats obtenus font l'objet d'une publication soumise (Delosière et al., 2015<sup>7</sup>).

### **Contenus fécaux**

Le projet ANR-ALIA SécuriViande (2011-2015) porté par Fabrice Pierre (ToxAlim, ALIMH) avait pour objectif de proposer des procédés de transformation des produits carnés de bœuf et de porc limitant l'effet promoteur de la carcinogenèse colorectale associé à leur consommation. Pour cela, l'objectif était de limiter les processus oxydatifs au niveau colique. Dans le cadre de ce projet, nous avons été chargés de développer le dosage de nos marqueurs d'oxydation en fin de tractus digestif. L'ensemble des mesures sur les fèces dans ce type d'expérimentation est réalisé habituellement sur les eaux fécales qui est la fraction biodisponible des fèces qui va interagir principalement avec la muqueuse intestinale (Pierre et al., 2003). L'eau fécale est obtenue à partir d'un broyage des fèces dans de l'eau, les composés d'intérêt sont alors solubilisés et extraits avec l'eau après centrifugation.

En utilisant la même méthode d'extraction que pour la viande, nos mesures ont alors permis de détecter les composés HNE et HHE sous leur forme libre. Cependant, nous ne retrouvons pas de forme liée. Trois hypothèses étaient alors possibles : **1)** soit les formes liées n'existaient pas à ce niveau du tube digestif, les protéines étant largement dégradées en amont, soit **2)** le HNE et le HHE étaient liés à des peptides issus de la dégradation des protéines et nous ne possédions pas la méthode de récupération de ces formes liées aux peptides **3)** soit enfin ces formes liées ne se retrouvaient pas dans les eaux fécales. Nous avons réalisé des mesures directement sur des fèces fraîches brutes qui nous ont montrés que les composés sous leur forme liée étaient bien présents dans cette matrice. Toutefois un recueil de fèces brutes fraîches est impossible à grande échelle sur plusieurs rats en expérimentation. Nos essais suivants nous ont donc conduits à travailler sur la fraction « culot de fèces » non utilisée après l'obtention des eaux fécales. Cette fraction qui est habituellement éliminée, a été conservée, broyée à l'azote liquide puis soumise à notre mode opératoire.

Nous avons bien détecté et quantifié nos composés HNE et HHE liés aux protéines et/ou aux peptides dans cette fraction solide de notre matrice "fèces". Nous avons déterminé les conditions spécifiques de traitement de cette nouvelle matrice, à savoir une prise d'essai de 400 mg de matrice et des étapes de filtrations sur laine de verre et filtre 0,44 µm comme pour la matrice "contenu gastrique" pour l'obtention d'un signal correct en CPG-SM/SM.

Suite à l'amélioration de l'étape d'extraction décrite ci-dessus, nous avons cherché à évaluer les performances de cette méthode de dosage. Pour ce faire, nous avons choisi l'approche du Profil d'Exactitude proposée par Feinberg (2007) et retenue comme méthode de référence dans le référentiel INRA version 2.

### **Détermination des capacités de la méthode d'extraction des produits d'oxydation des AGPI pour leur mesure par CPG-SM/SM**

Pour illustrer la détermination des capacités de notre méthode, nous rapportons ici les essais réalisés pour la mesure du HNE-P sur les fèces de rat (ANR-ALIA SécuriViande).

---

<sup>7</sup> Soumis au Journal Food Chemistry, décembre 2015.



## Essais d'étalonnage

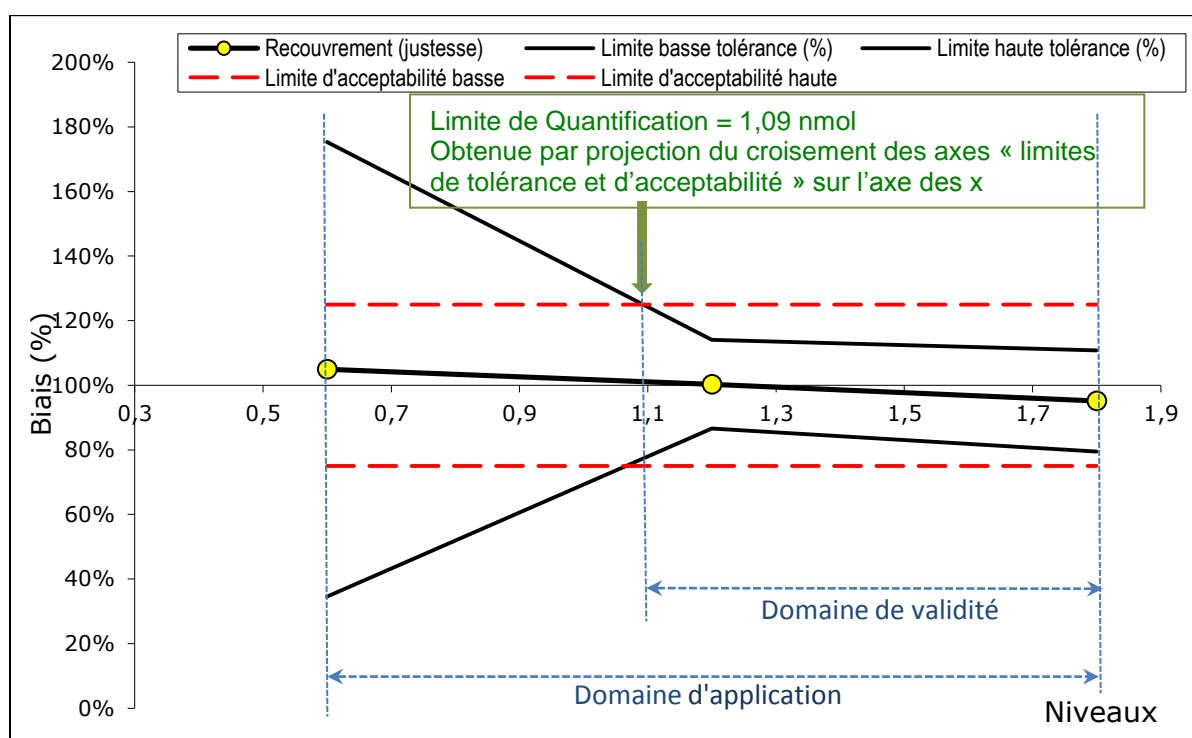
Le plan expérimental adopté consiste à analyser une gamme étalon associée à chaque série d'échantillons (comme réalisé lors des dosages en routine). Cette gamme a été obtenue à partir d'ajouts dosés d'analyte pur dans les culots de fèces. Nous avons réalisé cinq niveaux de concentrations allant de 0,5 à 3 nmol. Cette gamme nous a permis de définir le modèle de notre courbe d'étalonnage.

La fonction de réponse est linéaire de la forme  $y = ax + b$ .

## Essais de validation

Afin de représenter au mieux la matrice d'intérêt nous avons utilisé un pool de culots de fèces, dans lequel nous avons réalisé des ajouts dosés d'analyte pur de trois niveaux différents (faible / moyen / fort : 0,6 nmol / 1,2 nmol / 1,8 nmol). Nous avons extrait ces échantillons en triple et sur trois jours différents puis nous les avons quantifiés par CPG-SM/SM selon la méthode décrite par Gladine et al., (2012).

La caractérisation de la méthode de dosage du HNE-P dans des fèces est représentée par le tracé du profil d'exactitude selon la méthode de Feinberg (2007) (**Figure 3**).



**Figure 3.** Profil d'exactitude du dosage des composés HNE-P dans les culots de fèces avec une probabilité de tolérance de 80 % et une limite d'acceptabilité de 25 %.

La limite de tolérance a été fixée dans notre cas à 80% (cette valeur est généralement choisie entre 80 et 95%, Feinberg, 2010). La limite d'acceptabilité correspond à l'écart acceptable autour de la valeur de référence définie en collaboration avec les chercheurs, elle a été fixée à 25%. Ces valeurs peuvent bien évidemment être modifiées en fonction des exigences des "commanditaires" selon les besoins expérimentaux.

Notre méthode présente une limite de quantification de 1,09 nmol et est validée entre 1,09 et 1,80 nmol. Ce domaine a été choisi assez étroit dans un premier temps ce qui est limitant, mais qui permettait de répondre à notre besoin immédiat et qui ne nécessitait pas de rechercher des échantillons plus concentrés (que nous ne possédions pas à ce moment-là).

Par ailleurs, grâce au profil d'exactitude, il est possible de déterminer les incertitudes associées aux résultats rendus (**Tableau 3**). Ainsi par exemple, l'incertitude associée au niveau 1,20 nmol est de +/- 0,24 nmol. Cette donnée est essentielle pour le commanditaire, il pourra ainsi utiliser les résultats transmis avec plus de connaissances sur les limites des données et en tenir compte dans ses interprétations. Les caractéristiques de la méthode sont présentées dans le **Tableau 3** ci-dessous.

**Tableau 3.** Caractéristiques de la méthode de dosage du HNE-P dans les culots de fèces de rat

HNE-P			
Concentrations théoriques (nmol)	0,60	1,20	1,80
Moyenne des niveaux (nmol)	0,63	1,20	1,71
Limite de quantification (nmol)	1,09		
<b>Incertitudes relatives élargies (nmol)</b>	<b>± 0,56</b>	<b>± 0,24</b>	<b>± 0,40</b>

## Conclusions et perspectives

Notre méthode permet d'extraire les marqueurs spécifiques de la peroxydation des omégas 3 et 6 en vue de leur quantification par CPG-SM/SM à partir de différentes matrices biologiques. L'avantage principal de cette méthode est l'extraction conjointe des composés sous leurs deux formes libre et liée aux protéines/peptides à partir d'une même matrice. Nous avons déterminé le domaine de validité de cette méthode concernant une matrice particulière, les fèces de rat, cette approche étant transposable à toute nouvelle matrice. En perspectives de ce travail, il sera nécessaire de compléter les tests de validation pour le HNE-P, ainsi que pour les composés sous leur forme libre.

Il est également envisageable de tenter d'abaisser la limite de quantification ainsi que le domaine de validité de notre méthode. Pour cela, plusieurs stratégies peuvent être envisagées : **1)** nous pouvons tout d'abord ajouter de nouveaux points de gamme de concentrations plus faibles, permettant de mieux maîtriser la variance dans ces concentrations basses, ce qui dans bien des cas permet d'améliorer la limite de quantification. **2)** Il est également envisageable de tenter d'élargir le domaine de validité qui est actuellement assez étroit en ajoutant de nouveaux points de gamme au-delà des 1,8 nmol. Ces deux premières stratégies ne nécessitent pas de revalider l'ensemble du domaine, ce qui est un des avantages de la validation par le profil d'exactitude. **3)** Nous pouvons également envisager d'essayer de baisser la limite de quantification de notre méthode par amélioration de la purification de nos échantillons ou par modifications de la méthode d'analyse. Ceci est certainement la meilleure solution, mais il faudra dans ce cas reprendre l'ensemble du processus de validation dès lors que le mode opératoire est modifié.

En perspectives concernant l'effet matrice, dans le cadre d'un projet en cours nous devons réaliser ces mêmes dosages sur des échantillons digestifs d'origine humaine. Ceci nécessitera probablement des adaptations du fait de la diversité des régimes alimentaires chez l'homme qui ont un impact sur la nature même de la matrice fécale avec des teneurs différentes en fibres, en matières sèches, en protéines...

L'ensemble de ce travail a déjà permis de répondre à plusieurs interrogations sur les niveaux de peroxydation, aussi bien dans le domaine des transformations technologiques de la viande, que celui des processus digestifs suite à l'ingestion de viandes.

Enfin, il apparaît clairement que l'optimisation des conditions d'extraction des produits d'intérêt est essentielle à leur dosage et que l'approche de validation par le profil d'exactitude permet rapidement et avec un minimum d'échantillons d'obtenir des données fiables sur les performances des méthodes testées.

## Remerciements

Ce travail a été soutenu financièrement par deux crédits incitatifs PHASE (2009) et CEPIA (AIC Liprophen 2010-2011), ainsi que deux projets ANR : Lipivimus (2006-2009) et ALIA-SécuriViande (2011-2015).

## Références bibliographiques

ANSES (2011) Actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras. Saisine n°2006-SA-0359, ANC AG.

Asselin C, Bouchard B, Tardif JC, Des Rosiers C (2006) Circulating 4-hydroxynonenal-protein thioether adducts assessed by gas chromatography-mass spectrometry are increased with disease progression and aging in spontaneously hypertensive rats. *Free Radical Biology and Medicine* **41(1)** : 97-105.

Aurousseau B (2002) Oxygen radicals in farm animals. Physiological effects and consequences on animal products. *Inra Productions Animales* **15(1)** : 67-82.

Bauchart D, Gladine C, Gruffat D, Leloutre L, Durand D (2005) Effects of diets supplemented with oil seeds and vitamin E on specific fatty acids of rectus abdominis muscle in Charolais fattening bulls. In J. F. Hocquette and S. Gigli (Eds.), *Indicators of Milk and Beef Quality* : 431-436.

Bouvard V, Loomis D, Guyton KZ, Grosse Y, Ghissassi FE, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, et al. (2015) Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncol.* **16(16)** : 1599-1600. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00444-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00444-1).

Durand D, Scislowski V, Gruffat D, Chillard Y, Bauchart D (2005) High-fat rations and lipid peroxidation in ruminants ; consequences on the health of animals and quality of their products. In J. F. Hocquette and S. Gigli (Eds.), *Indicators of Milk and Beef Quality* : 137-150.

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine* **11(1)** : 81-128.

Feinberg M (2010) Principes et vocabulaire pour la validation des méthodes. Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude. *Cahier des Techniques Numéro spécial* : 13-25.

Feinberg M (2007) Validation of analytical methods based on accuracy profiles. *Journal of Chromatography A* **1158(1-2)**: 174-183.

Gladine C, Roy NC, Rigaudière JP, Laillet B, Da Silva G, Joly C, Pujos-Guillot E, Morio B, Feillet-Coudray C, McNabb WC, Chardigny JM, Comte B (2012) Increasing intake of long-chain n-3 PUFA enhances lipoperoxidation and modulates hepatic gene expression in a dose-dependent manner. *British Journal of Nutrition* **107(9)** : 1254-1273.

Gobert M, Cossou C, Comte B, Pujos-Guillot E, Gladine C, Joly C, Bauchart D, Durand D (2010) Les hydroxyalkénals liés aux protéines sont-ils des marqueurs discriminants de la peroxydation des AGPI n-3 et n-6 dans la viande bovine ? *13<sup>e</sup> Journées Sciences du Muscle et Technologie de la Viande*. Clermont-Ferrand, France.

Gobert M, Rémond D, Loonis M, Buffière C, Santé-Lhoutellier V, Dufour C (2014) Fruits, vegetables and their polyphenols protect dietary lipids from oxidation during gastric digestion. *Food & Function* **5** : 2166-2174.

**C. Chantelauze, C. Joly, M. Delosière, B. Comte, O. Martin , F. Pierre, N. Naud, C. Dufour, E. Pujos-Guillot, A. Thomas, D. Durand**

Ishikado A, Nishio Y, Morino K, Ugi S, Kondo H, Makino T, Kashiwagi A, Maegawa H. (2010) Low concentration of 4-hydroxy hexenal increases heme oxygenase-1 expression through activation of Nrf2 and antioxidative activity in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **402(1)** : 99-104.

Légrand P, Bourre J.M, Descomps B, Durand G, Renaud S (2002) Les lipides. *Apports nutritionnels conseillés pour la population française*, AFSSA-CNERNA .Techniques et Documentation, Lavoisier Paris : 63-82.

Lesgards JF, Frayne IR, Comte B, Busseuil D, Rheume E, Tardif JC, Des Rosiers C (2009) Differential distribution of 4-hydroxynonenal adducts to sulfur and nitrogen residues in blood proteins as revealed using Raney nickel and gas chromatography-mass spectrometry. *Free Radical Biology and Medicine* **47(10)** : 1375-1385.

Norme NF V 03-110 (1998) Analyses des produits agricoles et alimentaires – Procédure de validation intra laboratoire d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence.

Pierre F, Tache S, Guéraud F, Rerole A.L, Jourdan M-L , Petit C (2006) Apc mutation induces resistance of colonic cells to lipoperoxide-triggered apoptosis induced by faecal water from haem-fed rats. *Carcinogenesis* **28 (2)** : 321-327.

Pierre F, Tache S, Petit C. R, Van Der Meer R, Corpet D. E (2003) Meat and cancer : haemoglobin and haemin in a low-calcium diet promote colorectal carcinogenesis at the aberrant crypt stage in rats. *Carcinogenesis* **24 (10)** : 1683-90.

Scislowski V, Bauchart D, Gruffat D, Laplaud PM, Durand D (2005) Effects of dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids protected or not against ruminal hydrogenation on plasma lipids and their susceptibility to peroxidation in fattening steers. *J Anim Sci* **83(9)** : 2162-74.

Véronneau M, Comte B, Des Rosiers C (2002) Quantitative gas chromatographic-mass spectrometric assay of 4-hydroxynonenal bound to thiol proteins in ischemic/reperfused rat hearts. *Free Radic Biol Med* **33** : 1380-2002.