

Biologie cellulaire et in vitro pour

Garantir une sécurité et une efficacité nutraceutique

AGROBIO



Département Tests de Biologie Fonctionnelle

Sécurité alimentaire

Bioaccessibilité

Biodisponibilité

Régénération cellulaire

Activité anti-oxydante

Activité anti-vieillessement

Prévention anti-tumorale

Service Analyse et Recherche

Ready-to-go et on-demand

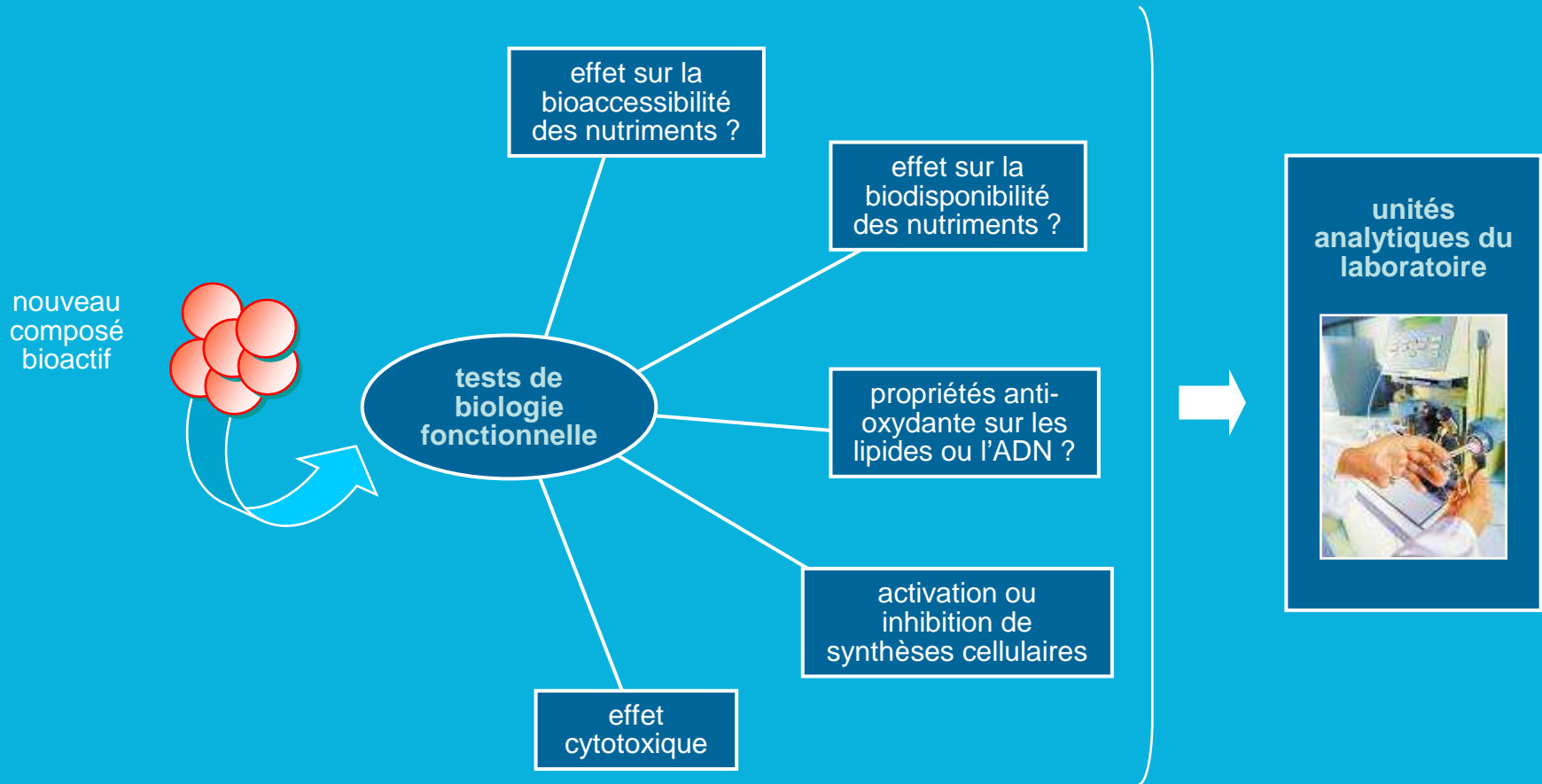
1. BIOLOGIE FONCTIONNELLE... ???

*La biologie fonctionnelle consiste à prédire ce qu'il pourrait se passer in vivo à l'aide **d'outil in vitro** ou **ex vivo** et à étudier le comportement cellulaire vis-à-vis de certaines molécules (ingrédients, actifs, produits finis, ...)*

INTÉRÊTS POUR L'INDUSTRIE :

- permet de répondre à des problématiques scientifiques, de marketing, d'allégations santé, ...
- fait appel à diverses disciplines comme la biochimie, la biophysique, la bioinformatique, les biotechnologies, les cultures cellulaires, ...)

2. UNITÉ DE BIOLOGIE FONCTIONNELLE ET UNITÉS ANALYTIQUES



3. TYPES D'ÉTUDES PROPOSÉES PAR LE DEPARTEMENT

- ➔ *ready-to-go* (« prêt à l'emploi »)
- ➔ *on-demand* (« à façon »)

▪ IN VITRO

*Etudes « en tube », utilisant strictement des outils chimiques ou biochimiques
(Ex : Tests de digestion in vitro, études d'activités enzymatiques, test ORAC, mesure de l'index glycémique in vitro)*

▪ EX VIVO

*Etudes sur cultures de cellules ou organes reconstitués
(Ex : Modèle épithélium intestinal reconstitué, cellules immunitaires)*

▪ IN VIVO

Etudes sur petits animaux

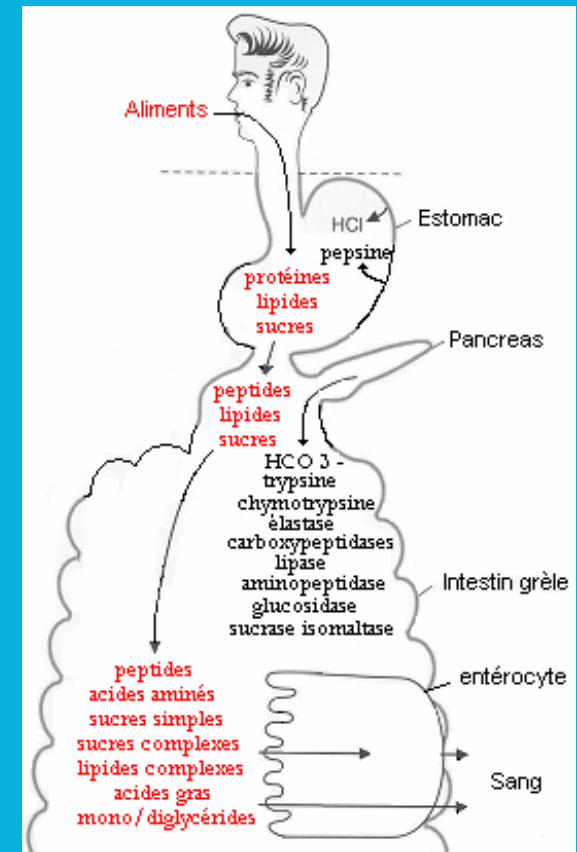
4. EXEMPLES D'ÉTUDE « *IN VITRO* »

BIOACCESSIBILITÉ DES ACTIFS ALIMENTAIRES / DIGESTION IN VITRO

- Capacité à se rendre disponible pour l'absorption intestinale
- Le bioactif ralentit ou accélère-t-il la libération d'une classe de nutriments ?
- Suivi de l'évolution de complexes nutriments /matrice au cours du processus de digestion
- Études comparatives

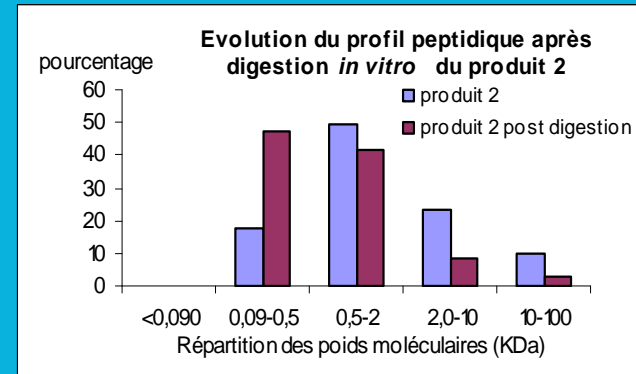
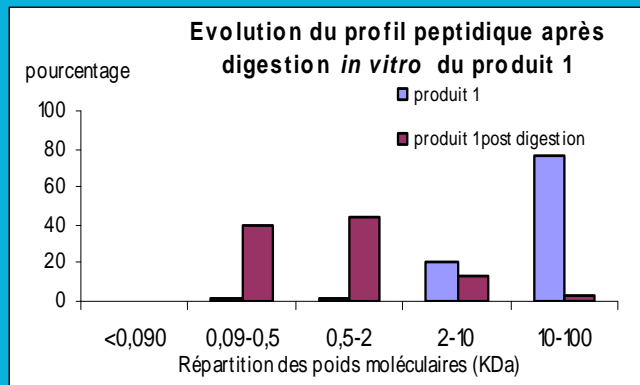
⇒ Utilisation d'une méthode qui mime les conditions physiologiques de la digestion humaine (modèle de R. Glahn)

(enzyme de l'estomac et HCl, puis enzymes intestinales)



4. EXEMPLES D'ÉTUDE « *IN VITRO* »

Comparaison de la digestibilité de deux produits à base de matières protéiques : profils peptidiques obtenus avant et après digestion par perméation de gel (méthode par HPLC). Les molécules sont séparées selon leur taille.



- Dans chacun des cas, les pourcentages des composés de haut poids moléculaires (>10 kDa) ont diminué au profit des peptides (2-10 kDa), oligopeptides (0,5-2 kDa) et acides aminés (100-500Da).
 - Le produit 1, nativement riche en protéines, donne majoritairement des acides aminés et des oligopeptides.
 - Le produit 2 riche au départ en peptides, est également dégradé en acides aminés et oligopeptides, mais donne un taux d'acides aminés libres plus fort que le produit 1 (47% contre 40% respectivement).
- La matrice du produit 2 rend donc les acides aminés plus accessibles à l'absorption intestinale qui est l'étape suivante dans le devenir des aliments dans le tractus gastro-intestinal.

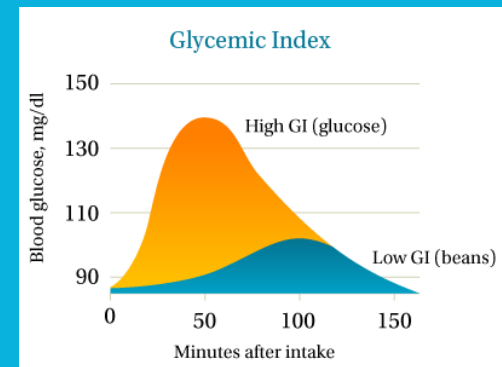
4. EXEMPLES D'ÉTUDE « *IN VITRO* »

EVALUATION APPROCHÉE IN VITRO DE L'INDEX GLYCEMIQUE / DIGESTION IN VITRO

➤ L'IG exprime la valeur de la réponse glycémique d'une portion d'aliment testé contenant 50g d'hydrate de carbone par rapport à une quantité d'aliment de référence (le pain blanc ou le glucose) contenant elle aussi 50 g d'hydrate de carbone.

➤ Habituellement étudiée in vivo par le dosage du glucose sanguin après une prise de sang (long et coûteux).

➤ Développement d'une méthode in vitro basée sur la simulation de la digestion humaine in vitro et le dosage du glucose par HPLC (sucre à assimilation rapide - RAG) puis corrélation avec la table établie par Foster-Powell et al. (2002). (= droite d'étalonnage réalisée avec plusieurs produits corrélatant les IG obtenus in vivo et le taux de RAG obtenus expérimentalement avec cette méthode).



4. EXEMPLES D'ÉTUDE « *IN VITRO* »

INDEX GLYCEMIQUE / DIGESTION IN VITRO (2)

- L'IG permet de classer des portions d'aliments contenant des quantités équivalentes de glucides disponibles en fonction de leur potentiel hyperglycémiant.
- Ce paramètre donne une estimation de la nature des sucres contenus dans l'aliment : composition majoritairement en sucres à assimilation rapide (RAG : rapidly available glucose) ou lente (SAG : slowly available glucose).
- Il permet également un classement des aliments en index glycémique fort (taux de RAG >70), moyen (taux de RAG entre 55 et 70) et faible (taux de RAG <55)

⇒ S'il reflète le type de courbe glycémique que provoquera l'aliment in vivo, il n'indique pas la proportion de sucre contenue dans l'aliment. C'est une mesure **qualitative** et non quantitative.

- Outil intéressant pour le développement d'un produit : il permet de connaître rapidement l'impact d'une formulation sur l'IG et permet la multiplication des essais en R&D, limitant les coûts d'analyse et la durée de développement du produit.

4. EXEMPLES D'ÉTUDE « *IN VITRO* »

CAPACITE ANTIOXYDANTE GLOBALE / TEST ORAC

- Les molécules anti-oxydantes peuvent agir de diverses façon : par captage des radicaux libres (tocotriénols, coenzyme Q10, acide lipoïque, flavonoïdes), par régénération des systèmes de captage (vitamine E et C), par action enzymatique de dégradation des radicaux libres (SOD, GPX), par chélation des métaux pro-oxydant (polyphénols), ...
- Une part significative des défenses naturelles provient de la nourriture. Les constituants nutritionnels possédant une activité anti-oxydante sont le plus souvent d'origine végétale (fruits et légumes en particulier)
- La méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) permet une mesure globale du pouvoir antioxydant de substances pures ou en mélange comme dans les produits finis. C'est une mesure standardisée et largement acceptée du pouvoir antioxydant.

4. EXEMPLES D'ÉTUDE « *IN VITRO* »

CAPACITE ANTIOXYDANTE GLOBALE / TEST ORAC (2)

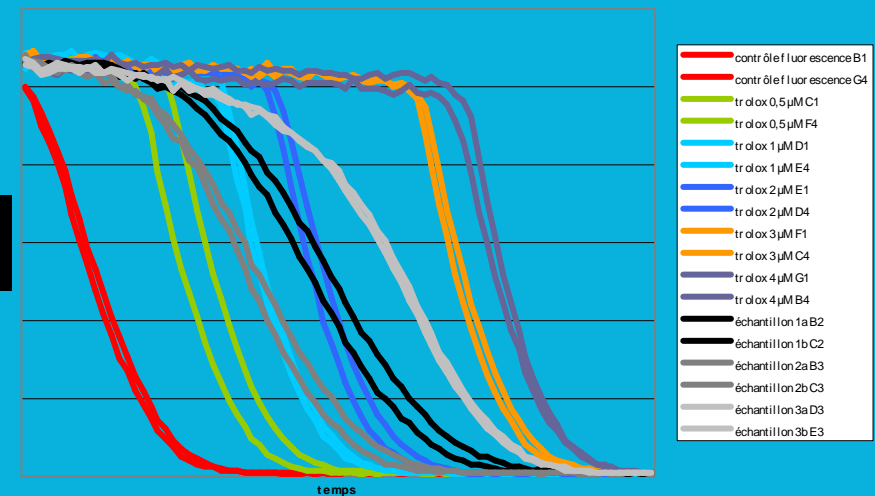
METHODOLOGIE :

➤ Extraction des principes actifs dans un mélange d'eau et de solvant organique (acétone, éthanol, ...) ou de solvant pur selon l'hydrophobie des composés.

➤ Mesure de la protection exercée par le produit à tester contre l'oxydation de la fluorescéine par un radical libre stable, l'AAPH (mesure du pouvoir anti-radicalaire par une cinétique fluorimétrique).

➤ Les résultats exprimés par rapport à la protection exercée par un antioxydant de référence, le Trolox (équivalent hydrosoluble de la vitamine). Le test sur une gamme de concentration Trolox permet d'exprimer les résultats en μmol d'équivalent Trolox.

Courbe de décroissance de la fluorescence de la fluorescéine en présence d'AAPH et de différentes concentration de TROLOX



5. EXEMPLE D'ÉTUDE « *EX VIVO* »

PERMEABILITE INTESTINALE / BIODISPONIBILITÉ INTESTINALE

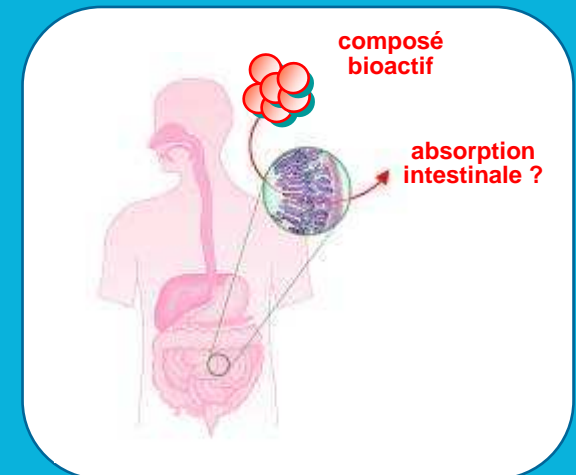
Définition de la biodisponibilité :

Fraction de dose d'un bioactif ou d'un nutriment absorbé après ingestion et digestion, qui sera utilisée pour le fonctionnement physiologique et /ou le stockage au sein de l'organisme.

Affectée par :

- Les paramètres physiologiques (digestion gastrique et intestinale, absorption intestinale, métabolisme intestinal et hépatique, ...)
- Les autres composants alimentaires (chélateurs, promoteurs d'absorption)
- Le traitement de l'ingrédient (fabrication, transformation, cuisson, ...)
- Les propriétés de la matrice alimentaire

⇒ Développement d'un modèle d'épithélium intestinal reconstitué avec les cellules humaines Caco-2 permettant d'étudier l'absorbabilité et la perméabilité intestinale d'un composé bioactif

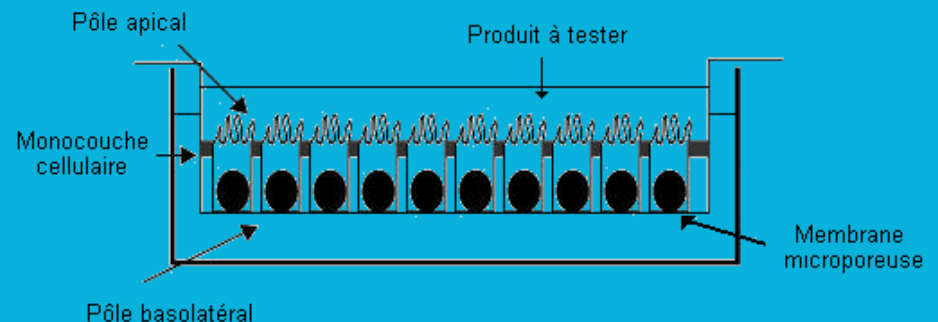


5. EXEMPLE D'ÉTUDE « *EX VIVO* »

PERMEABILITE INTESTINALE / BIODISPONIBILITÉ INTESTINALE

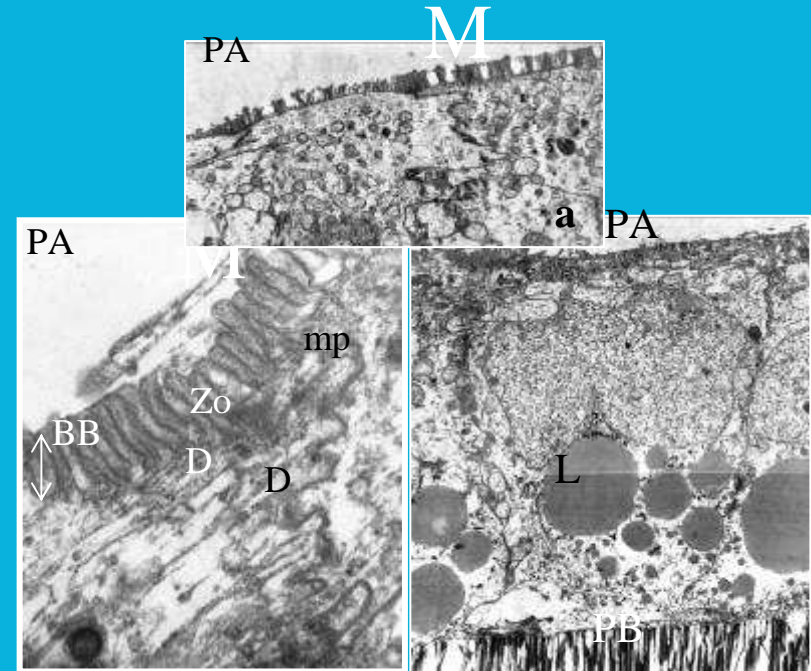
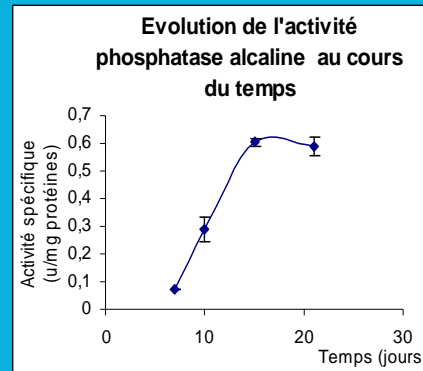
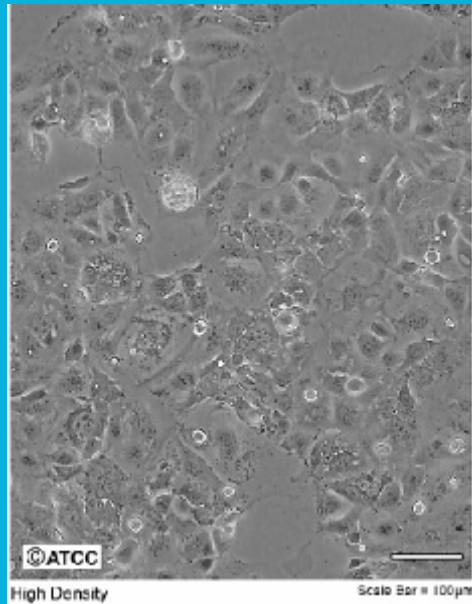
LE MODELE EPITHELIUM INTESTINAL-LIKE :

- Modèle d'épithélium intestinal reconstitué *ex vivo* avec des cellules intestinales humaines Caco-2 : Mime l'épithélium intestinal de l'Homme.
- Modèle très largement utilisé, flexible (un seul des paramètre peut être modifié), pas d'interférences avec l'environnement complexe *in vivo* (défaut aussi : modèle simpliste)
- Permet d'étudier la biodisponibilité d'un composé bioactif ou de screener comparativement des molécules ou ingrédients vis-à-vis de l'absorption intestinale.
- Modèle permettant de prévoir *in vitro* ce qu'il peut se passer *in vivo* : il existe une corrélation entre le paramètre Papp (perméabilité apparente) calculé à partir de l'expérimentation réalisée sur le modèle cellulaire Caco-2 et le pourcentage d'absorption *in vivo* chez l'Homme.
- Faible coût comparativement à une expérimentation chez l'animal ou l'Homme.



LE MODELE EPITHELIUM INTESTINAL-LIKE

Caco-2 : Cellules carcinomateuses colorectales humaines, exprimant sous certaines conditions les critères morphologiques et fonctionnels des cellules intestinales (forment un épithélium pavimenteux, poussent en monocouche, présentent des microvillosités, des enzymes spécifiques de l'épithélium intestinal, des complexes de jonction, ...)

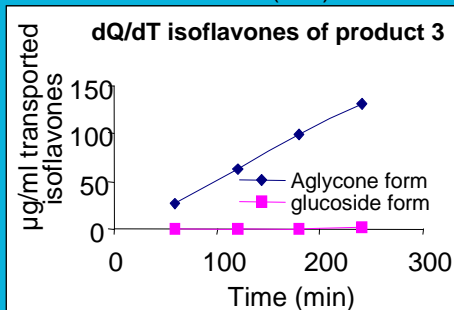
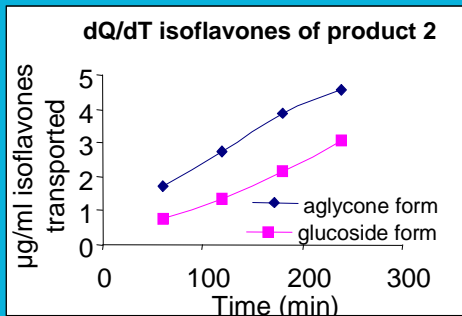
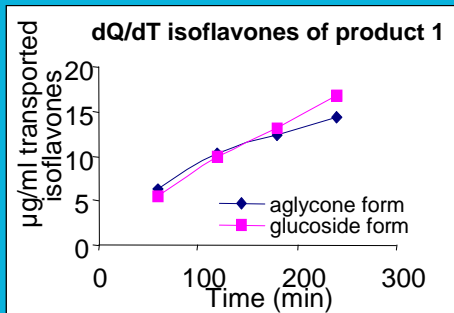


Monocouche Caco2 observée au microscope optique inversé, Gx1000

Photos prises au MET - coupe transversales (G*4000 (a, b) to 20000 c)), PA : pole apical , PB : pole basolatéral , mp : membrane plasmique, BB : bordure en brosse, M: microvillosités, Zo+D : Complexe de jonction

5. EXEMPLE D'ÉTUDE « EX VIVO » (réalisé chez NURINOV)

Etude comparative pour choisir entre 3 produits à base d'isoflavones de soja, celui qui donne la meilleure absorption intestinale pour les formes aglycones d'isoflavones (formes actives) :



Produit	Papp des formes aglycones (cm/sec)	Papp des formes glycosylées (cm/sec)
1	$4,34 \cdot 10^{-5}$	$3,97 \cdot 10^{-6}$
2	$3,54 \cdot 10^{-5}$	$5,49 \cdot 10^{-7}$
3	$4,86 \cdot 10^{-5}$	$9,09 \cdot 10^{-7}$

Expérimentation réalisée en triplicate à partir d'une concentration de départ de 100µg/ml d'isoflavones.

* Produit 1 : Produit ayant un profil en isoflavones semblable à celui de la graine de soja.

* Produit 2 : Produit enrichi en isoflavones de soja glycosylées.

* Produit 3 : Produit enrichi en isoflavones de soja aglycones.

⇒ Le produit 3 donne les meilleurs résultats. (meilleure Papp et plus grande quantité absorbée). Meilleur choix comme matière première pour formulations enrichies en isoflavones de soja biodisponibles.

5. EXEMPLES D'ÉTUDES « EX VIVO »

CORRELATION IN VITRO (sur cellules Caco-2) / IN VIVO (chez l'Homme) : (résultats issus de la littérature)

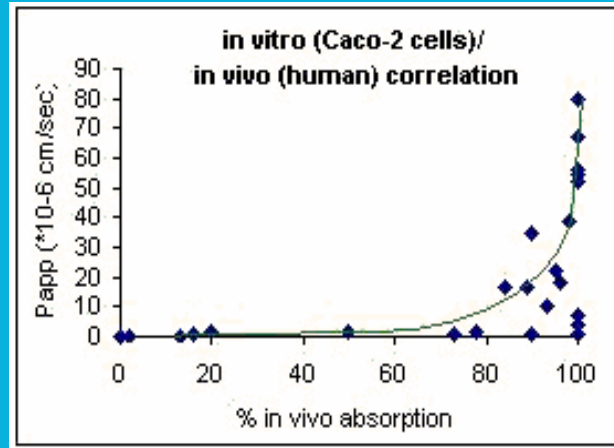


	Table de corrélation in vitro / in vivo		
Papp (cm/sec) sur les cellules Caco-2	<1,2* 10 ⁻⁶	1,2* 10 ⁻⁶ - 10* 10 ⁻⁶	>10* 10 ⁻⁶
% absorption in vivo (Chez l'Homme)	<20%	20-75%	>75%
classification	Faiblement absorbé	Moyennement absorbé	Fortement absorbé

⇒ L'évaluation de la perméabilité intestinale sur le modèle cellulaire Caco-2 permet d'avoir une idée de ce qu'il se passe chez l'Homme.

6. EXEMPLES D'ÉTUDES « *EX VIVO* » (issus de la littérature)

- Influence of heat treatment of casein in presence of reducing sugars on Zn solubility and Zn uptake by Caco-2 cells after in vitro digestion. Seiquer I., Valverde A., Delgado-Andrade C., Navarro MP., J. Physiol. Biochem. 2000, 56(3):237-246.
→ Un traitement thermique des caséines en présence de sucres réducteurs a un effet négatif sur la biodisponibilité du zinc.
- Red grape juice inhibits iron availability : application of an in vitro digestion / Caco-2 cell model. Boato F., Wortley GM., Liu RH., Glahn RP. J. Agric Food Chem. 2002 50(23):6935-6938.
→ Le jus de raisin rouge inhibe la biodisponibilité du fer à cause des polyphénols qu'il contient alors que les jus de poire, pamplemousse, pomme, orange, raisin blanc favorisent l'absorption du fer.
- Inhibition of iron uptake by phytic Acid, Tannic acid, and ZnCl₂ : studies using in vitro digestion / Caco-2 cell model. Glahn RP, Wortley GM., J. Agric. Food Chem. 2002, 50:390-395
Donne des informations pour déterminer la biodisponibilité des ions inclus dans des milieux complexes (repas)

6. EXEMPLES D'ÉTUDES « *EX VIVO* » (issus de la littérature)

- Assessment of carotenoid bioavailability of whole foods using a Caco-2 cell culture model coupled with an in vitro digestion. J. Agric. Food Chem. 2004, 52(13):4330-4337.

→ Montre que le modèle Caco-2 couplé à la digestion in vitro est utilisable pour l'étude de nutriments inclus dans des aliments entiers.

- Participation au programme NUTRITION SANTE EN BRETAGNE avec le CEVA (2005)

- Biodisponibilité de l'iode issu de différentes matrices alimentaires :

- algues : brune, verte, rouge

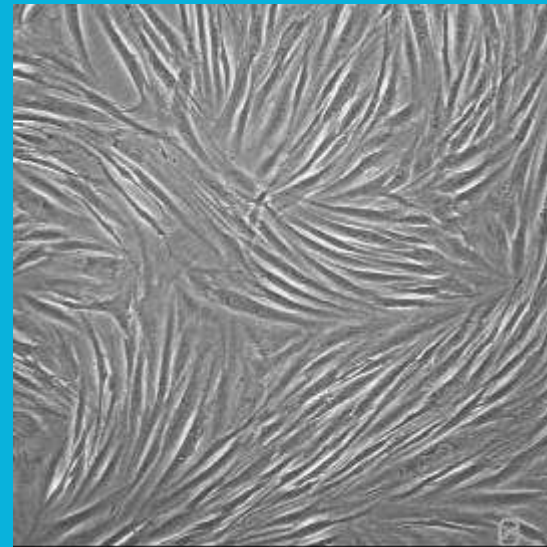
- lait, œufs, iodure de sodium

L'étude de la perméabilité intestinale de l'iode à l'aide du modèle cellulaire Caco-2 a permis de trouver une alternative naturelle de la iodation du sel de cuisine (l'iode des algues brunes semblait plus accessible que celui des algues vertes ou rouges, et est comparable à l'iode du sel de cuisine)

7. AUTRES EXEMPLES D'ÉTUDES « *EX VIVO* »

A. STIMULATION DES FIBROBLASTES DE PEAU HUMAINE

- Cultures fibroblastes dermiques humains et traitement avec le produit d'intérêt en parallèle d'un témoin et d'un contrôle positif
- Evaluation de la stimulation des synthèses cellulaires (collagène type I, élastine, fibronectine, GAG, ...)



Culture de fibroblastes observée au microscope optique inversé

⇒ Modèle monocellulaire alors que la peau est constituée de plusieurs types cellulaires.

7. AUTRES EXEMPLES D'ÉTUDES « EX VIVO »

B. PRÉVENTION ANTITUMORALE ET PROTECTION CONTRE L'OXYDATION DE L'ADN ET APOPTOSE

Vieillessement, cancers et maladies cardio-vasculaires sont potentialisés par l'altération de l'ADN.

- Méthode de quantification de produits d'oxydation de l'ADN issus de cultures cellulaires

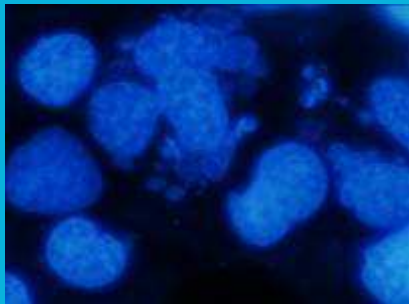
Dosage 8odG

- Cultures cellulaires et traitement avec le produit d'intérêt en parallèle d'un témoin négatif et d'un contrôle positif inducteur d'oxydation
- Evaluation de la capacité anti-oxydante de l'ADN par mesure directe du marqueur biologique 8odG. (Plus le produit est efficace moins il y a de 8odG de créé)

Test 3D (DNA damage detection)

- Evaluation de la capacité anti-oxydante de l'ADN par mesure indirecte en utilisant le système de réparation cellulaire. (Plus il y aura eu d'oxydation à réparer, plus le signal sera fort). Système permettant aussi d'étudier l'effet du produit sur le système de réparation cellulaire de l'ADN.

- Evaluation des propriétés apoptotiques par observations morphologiques de l'ADN en microscopie à épifluorescence après culture sur lames



⇒ D'autres méthodes existent notamment par détection de marqueur spécifique par ELISA

Fragmentation de l'ADN et corps apoptotiques ; Coloration de l'ADN au Hoecht et observation au microscope à épifluorescence

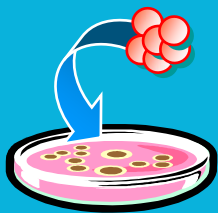
7. AUTRES EXEMPLES D'ÉTUDES « EX VIVO »

C. PROTECTION CONTRE L'OXYDATION DES LIPIDES MEMBRANAIRES CELLULAIRES

- Lutte contre le vieillissement cellulaire : Quantification de l'oxydation des lipides cellulaires membranaires
 - Cultures cellulaires et traitement avec le produit d'intérêt en parallèle d'un témoin négatif et d'un contrôle positif inducteur d'oxydation.
 - Evaluation de la capacité protectrice des lipides membranaires contre l'oxydation par le dosage des TBARS.

D. SÉCURITÉ ALIMENTAIRE / TEST DE CYTOTOXICITÉ

- Contrôle de l'innocuité d'un bioactif
- Tests sur cellules intestinales et/ou hépatocytaires d'origine humaine ou autres



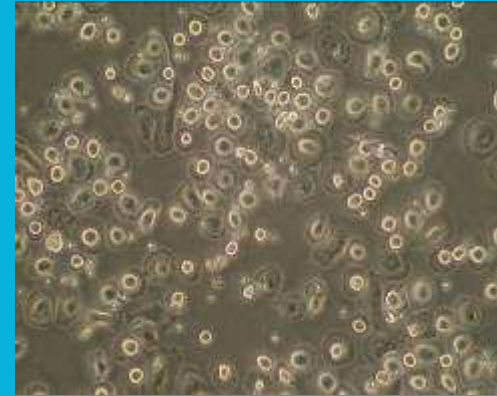
quantification de marqueurs
représentatifs de l'état
physiologique cellulaire

- test MTT (activité mitochondriale)
- test LDH (dommages membranaires)
- test par le rouge neutre (colorant vital du lysosome)
- étude morphologique
- viabilité...

7. AUTRES EXEMPLES D'ÉTUDES « EX VIVO »

E. IMMUNOMODULATION (Collaboration avec la faculté de Pharmacie de Rennes)

- Dosage des cytokines produites par les cellules du système immunitaire en culture après contact avec le produit à tester.
- Etude réalisée sur un type cellulaire particulier ou sur l'ensemble des cellules du système immunitaire.
- Dosage des réponses mono-cytokinique ou multiparamétrique.

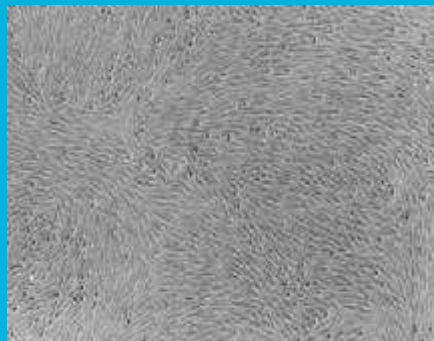
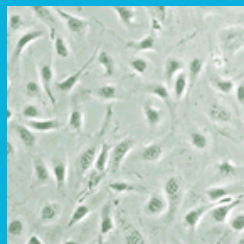


Culture de macrophages

F. VASODILATATION / LIBERATION DU NO PAR LES CELLULES ENDOTHELIALES

→ Tests réalisés sur des cellules endothéliales en culture (HUVEC)

- Cultures cellulaires et traitement avec le produit d'intérêt en parallèle d'un témoin négatif et d'un contrôle positif de production de NO.
- Dosage du NO libéré grâce à une sonde fluorescente. Le contrôle positif donne un signal de 100%. Le résultat est exprimé en pourcentage de réponse par rapport à ce maximum.



Cultures de cellules endothéliales HUVEC observées au microscope optique inversé

➔ *ready-to-go* (« prêt à l'emploi »)

➔ *on-demand* (« à façon »)

➔ *En développement :*

Modèle adipocytes

Test des LDL plasmatiques oxydées

ZAC des trois marches

3, Impasse de La Jonchée

F - 35132 VEZIN LE COQUET

Tel : +33 (0)2 99 14 70 50 / Fax +33 (0)2 99 14 70 51

Sites : <http://www.labo-nutrinov.com>

<http://www.laboratoiresagrobio.fr>