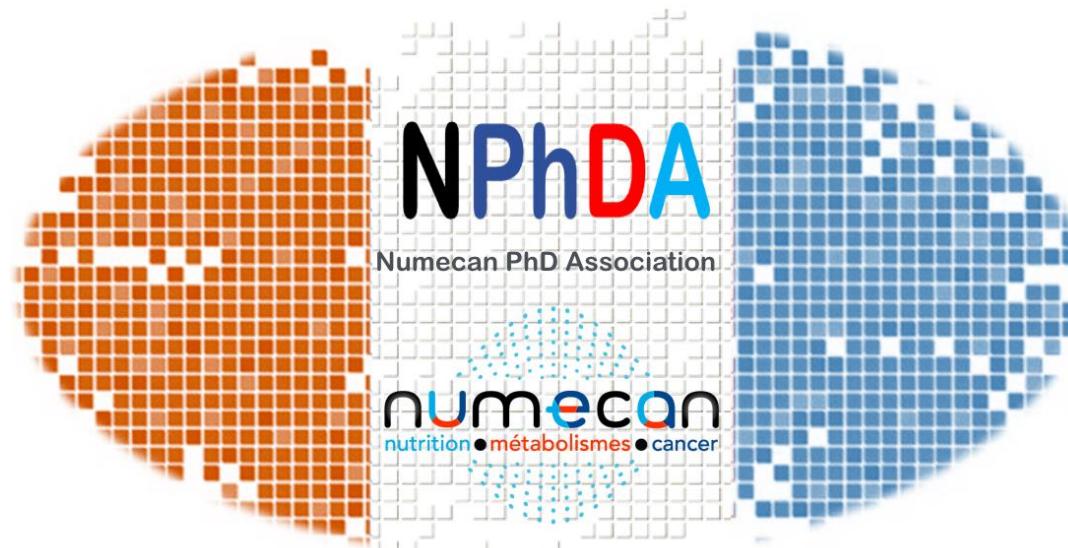


Introduction à l'utilisation de la HPLC

Yann Verres

Réunion technique de NPhDA du Mardi 3 Novembre 2020

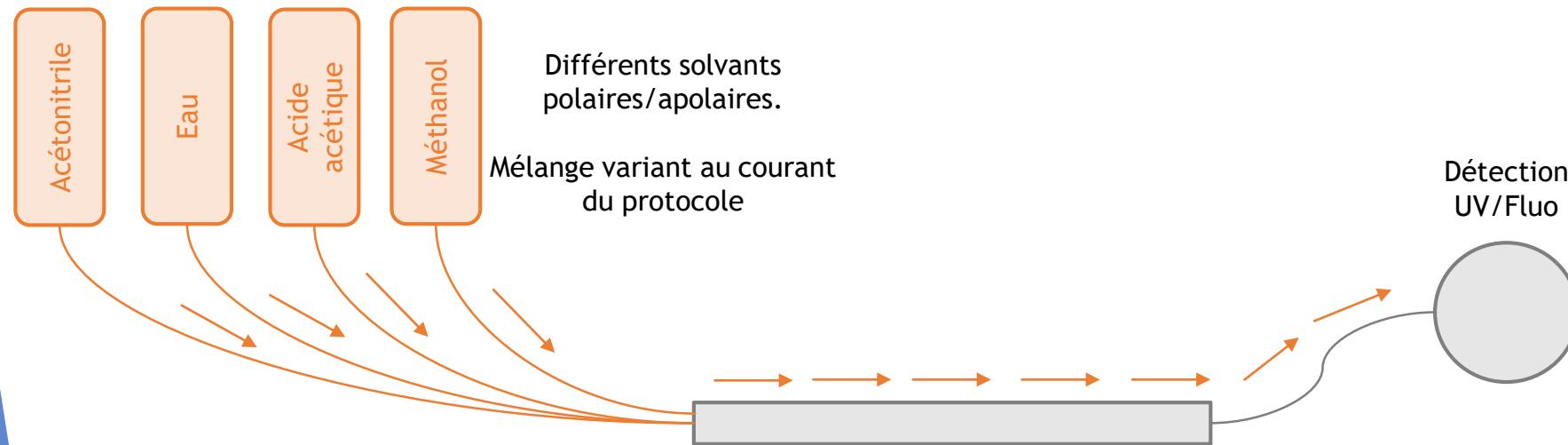


High Performance Liquid Chromatography

Technique de séparer et détecter les différents composants d'une matrice donnée

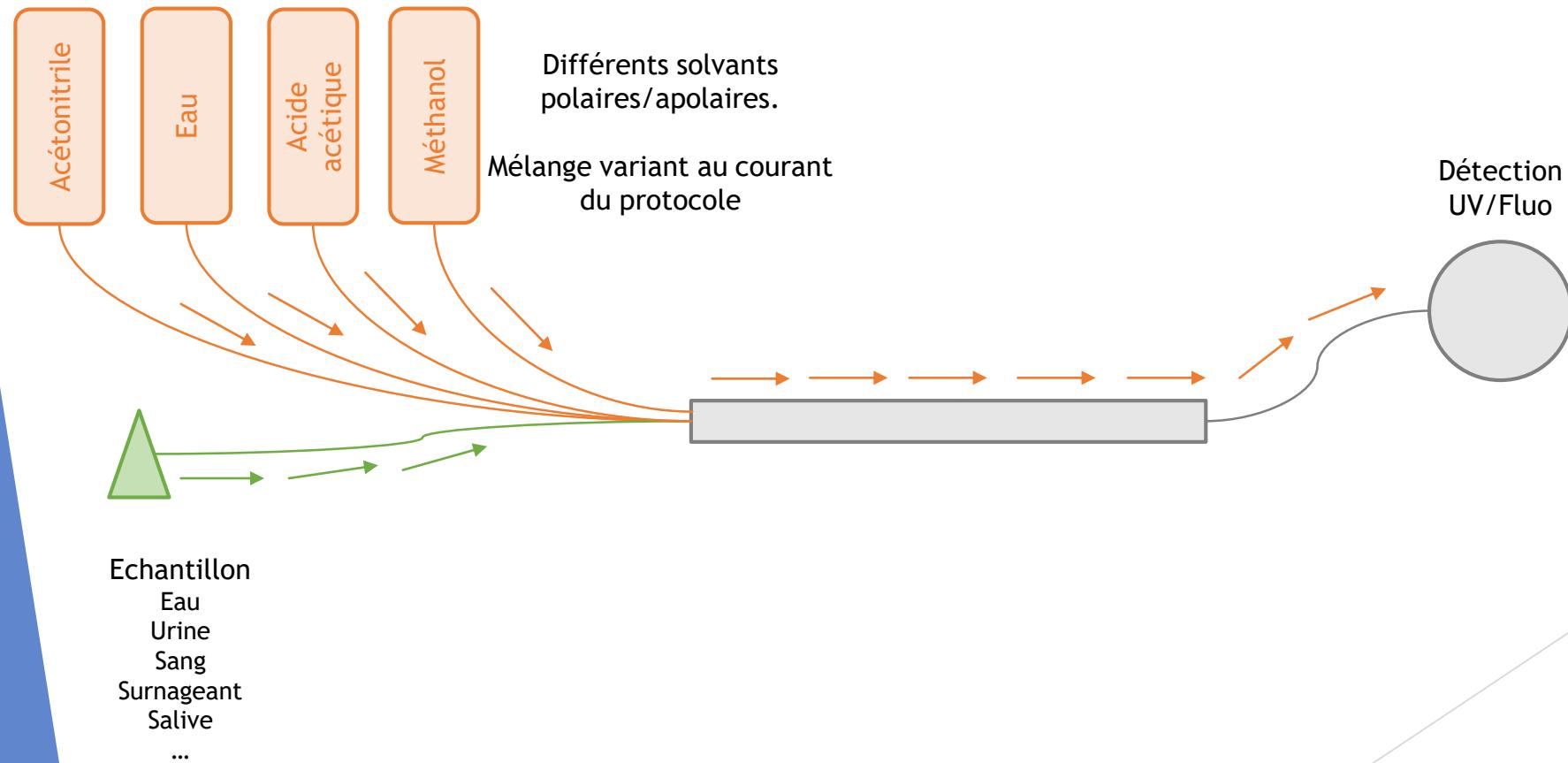
High Performance Liquid Chromatography

Technique de séparer et détecter les différents composants d'une matrice donnée



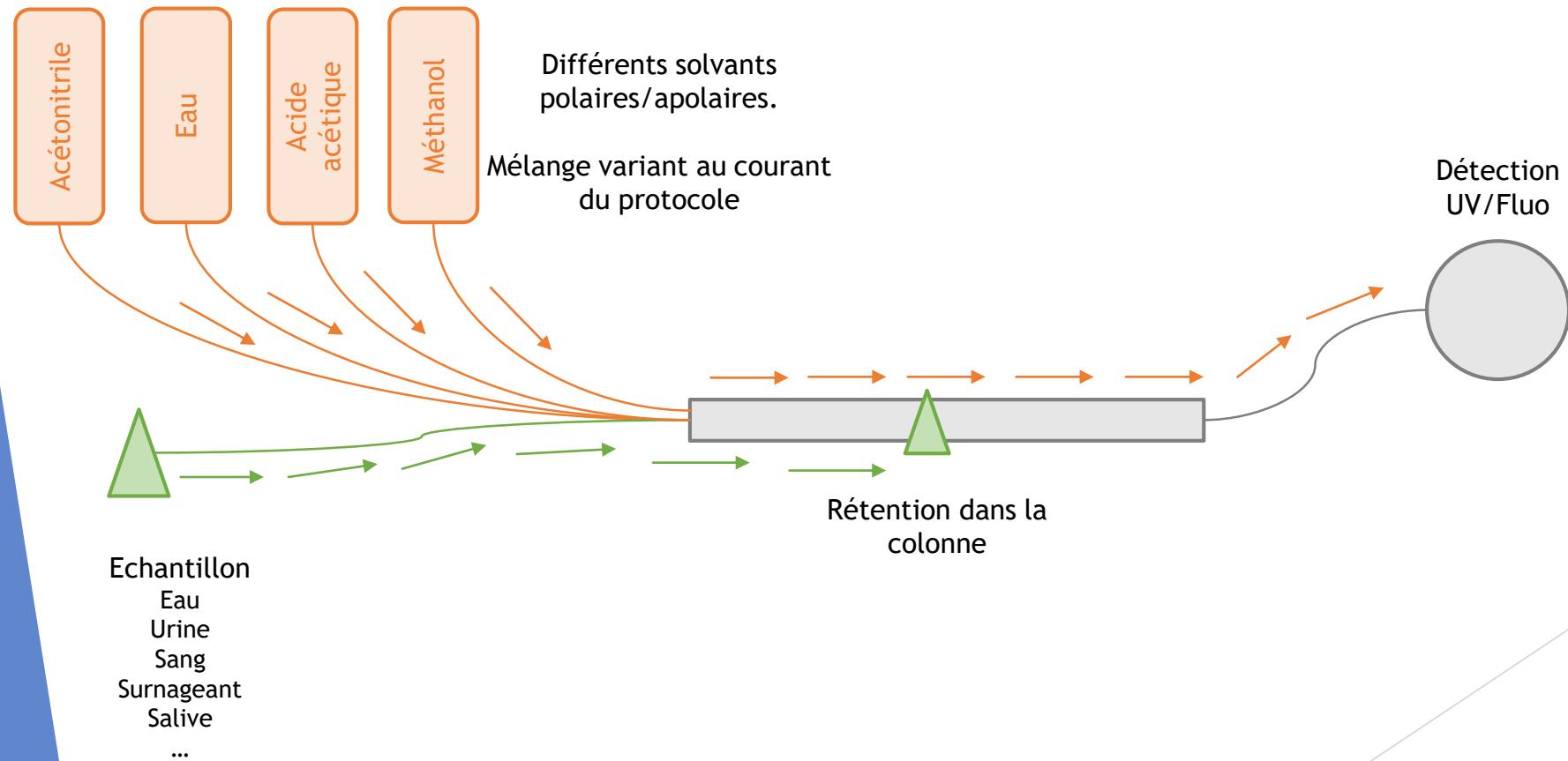
High Performance Liquid Chromatography

Technique de séparer et détecter les différents composants d'une matrice donnée



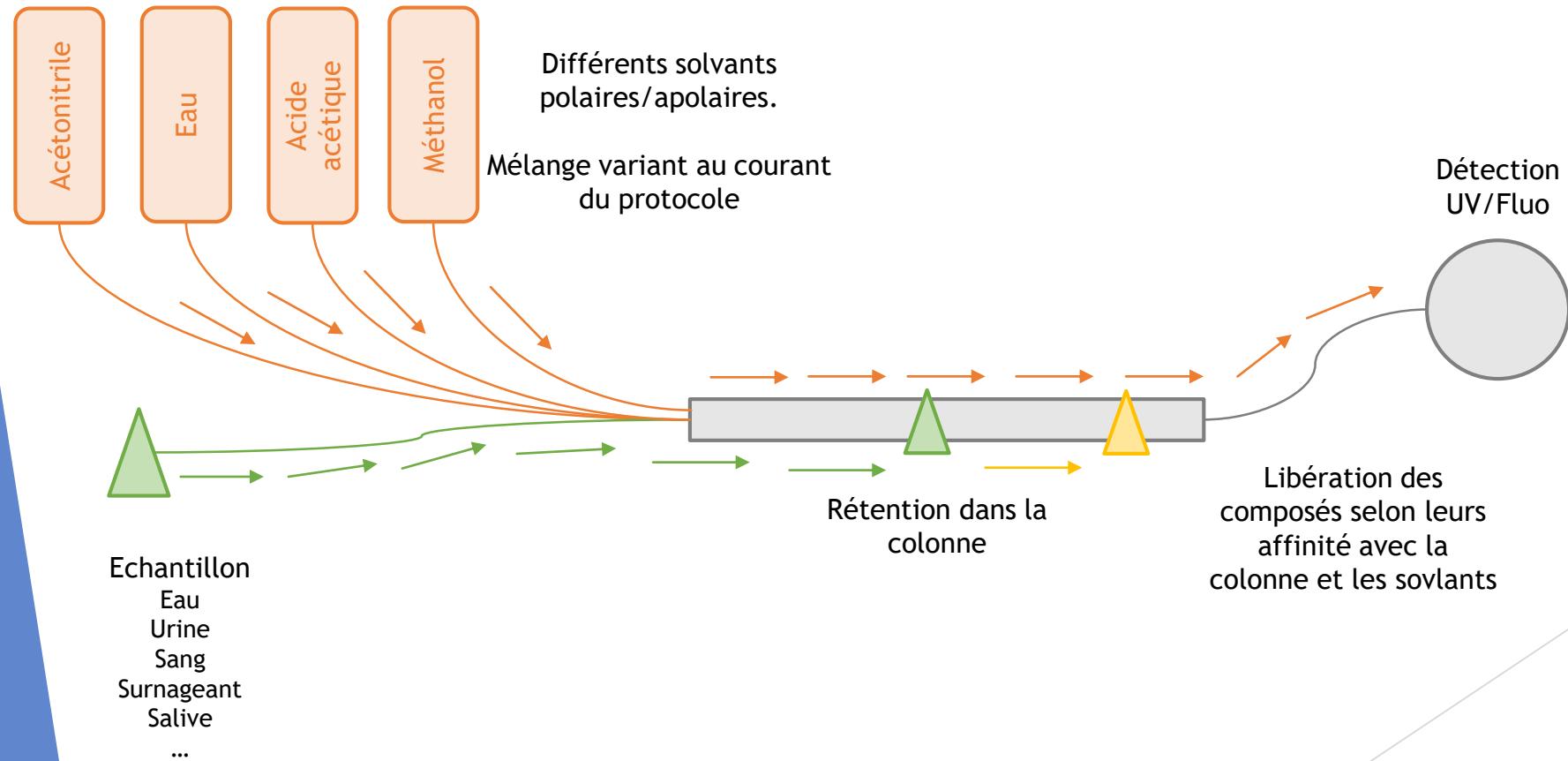
High Performance Liquid Chromatography

Technique de séparer et détecter les différents composants d'une matrice donnée



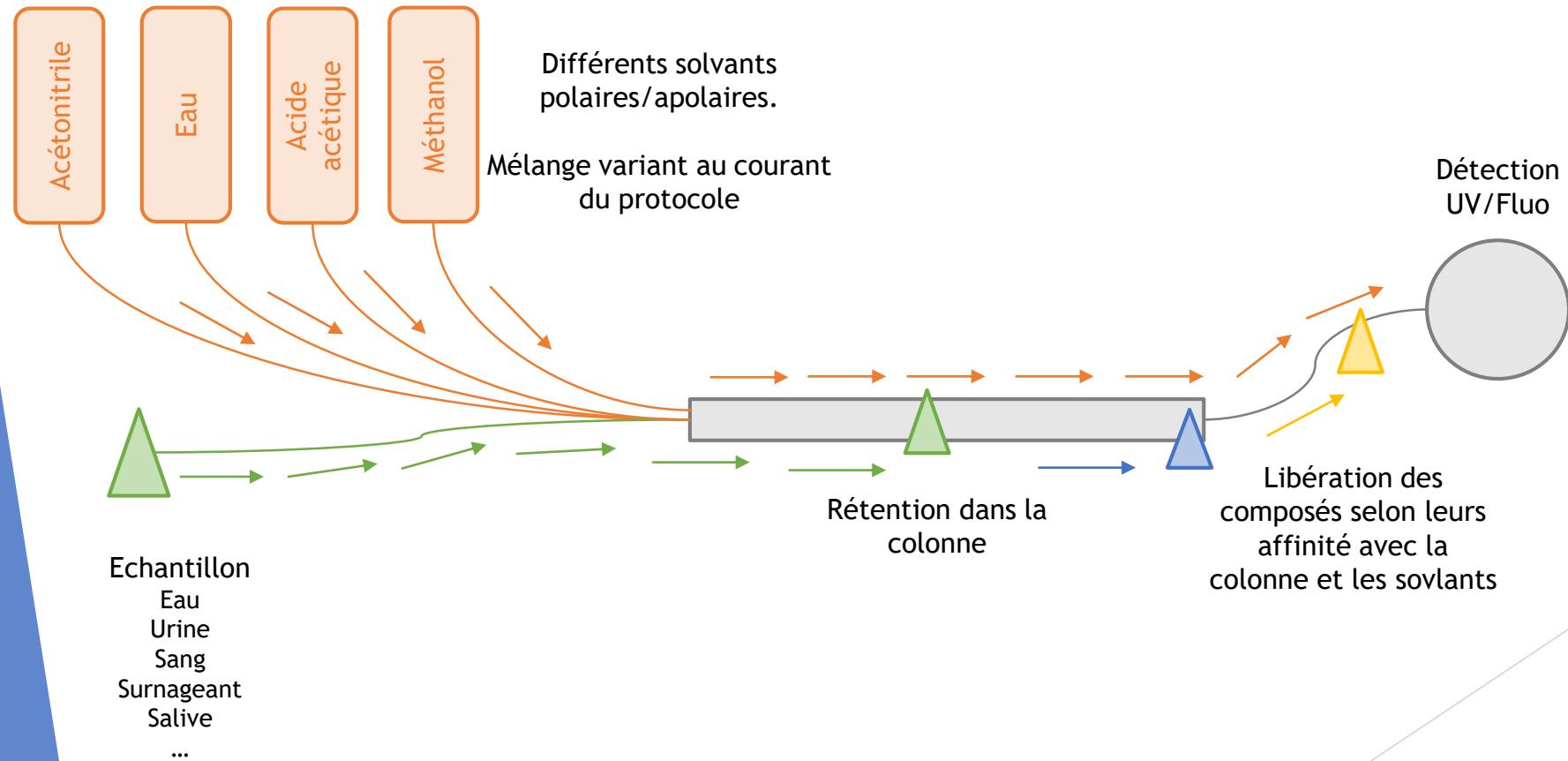
High Performance Liquid Chromatography

Technique de séparer et détecter les différents composants d'une matrice donnée



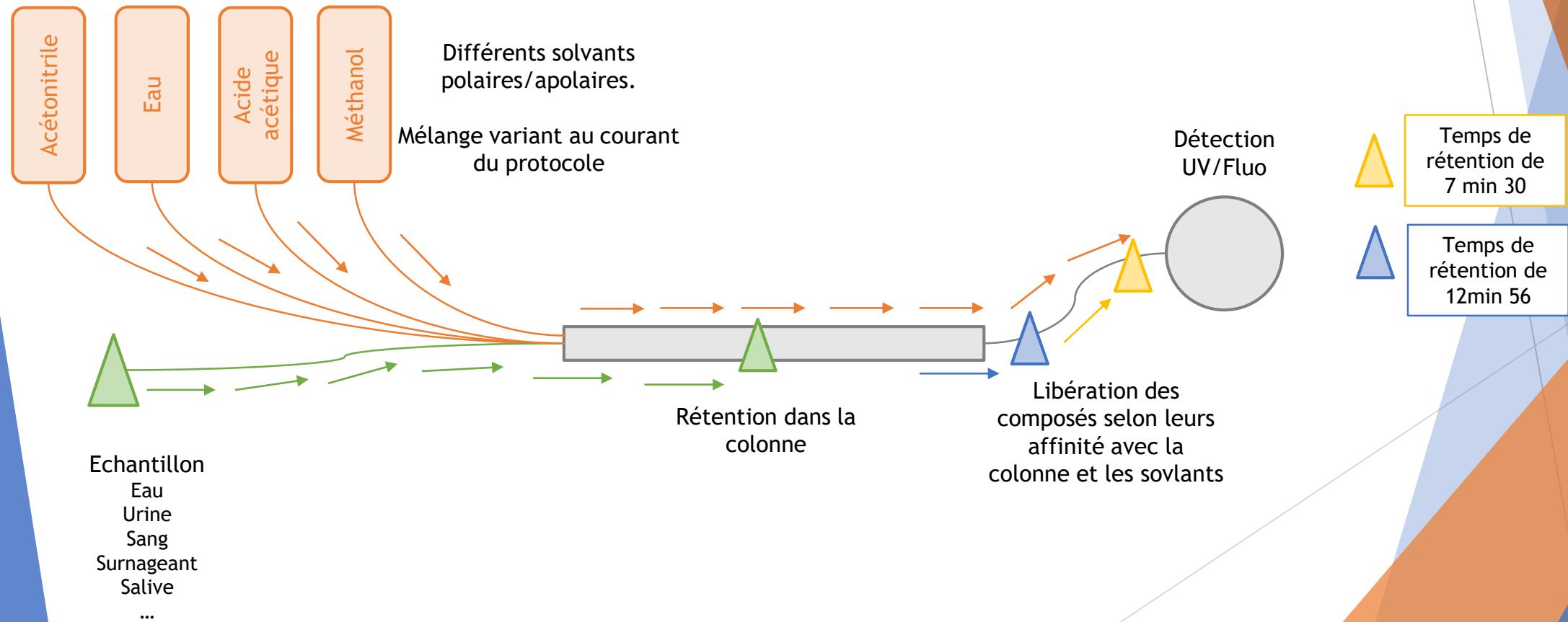
High Performance Liquid Chromatography

Technique de séparer et détecter les différents composants d'une matrice donnée



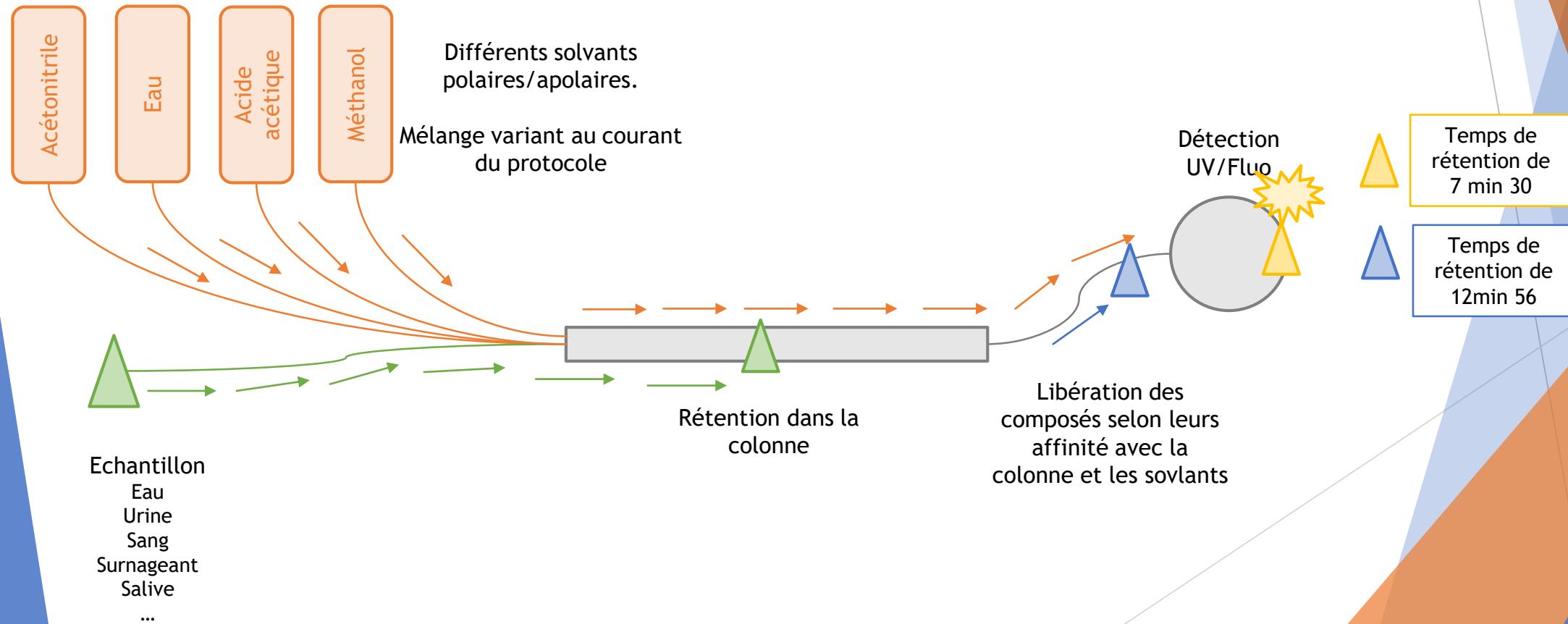
High Performance Liquid Chromatography

Technique de séparer et détecter les différents composants d'une matrice donnée



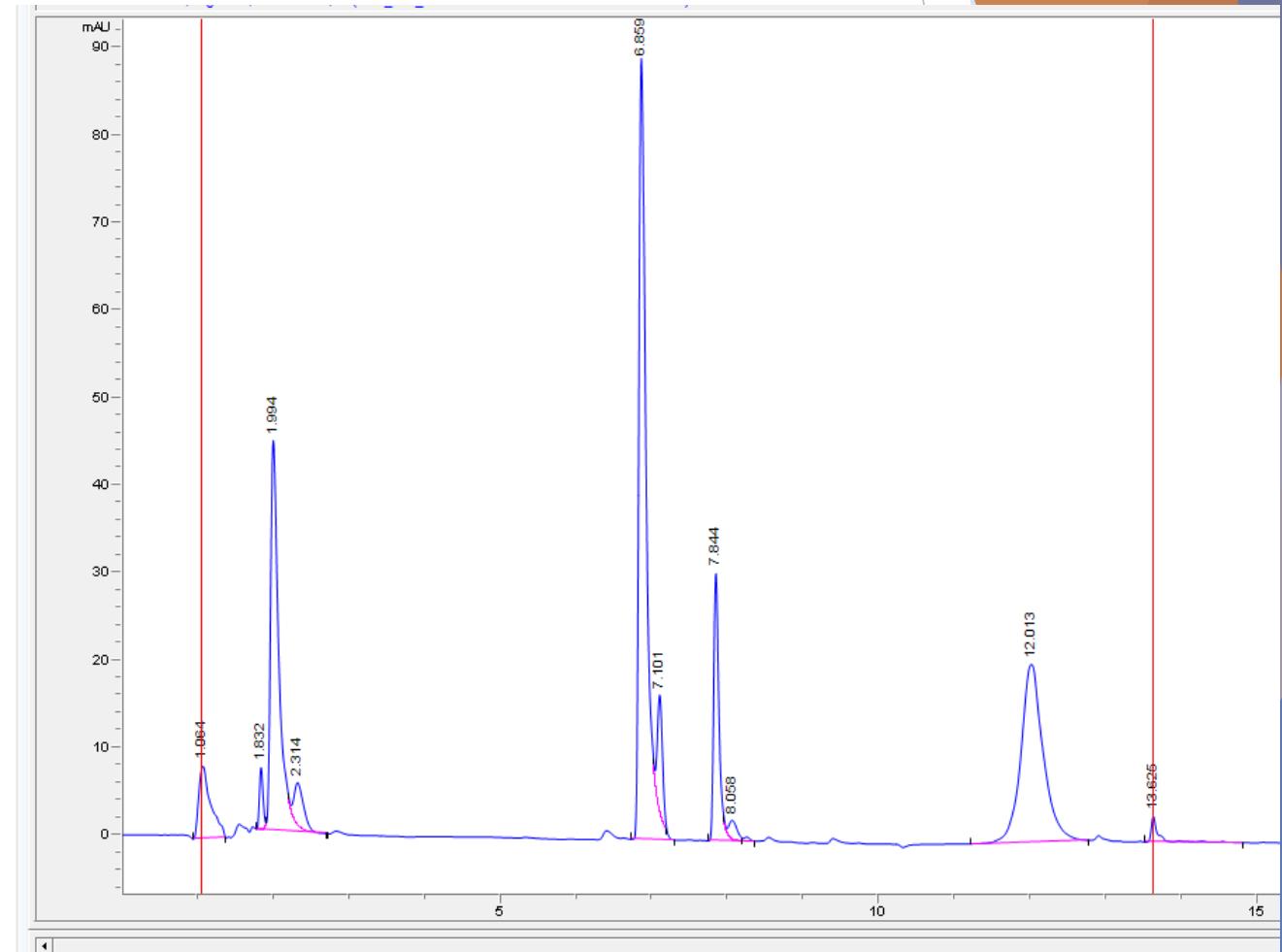
High Performance Liquid Chromatography

Technique de séparer et détecter les différents composants d'une matrice donnée

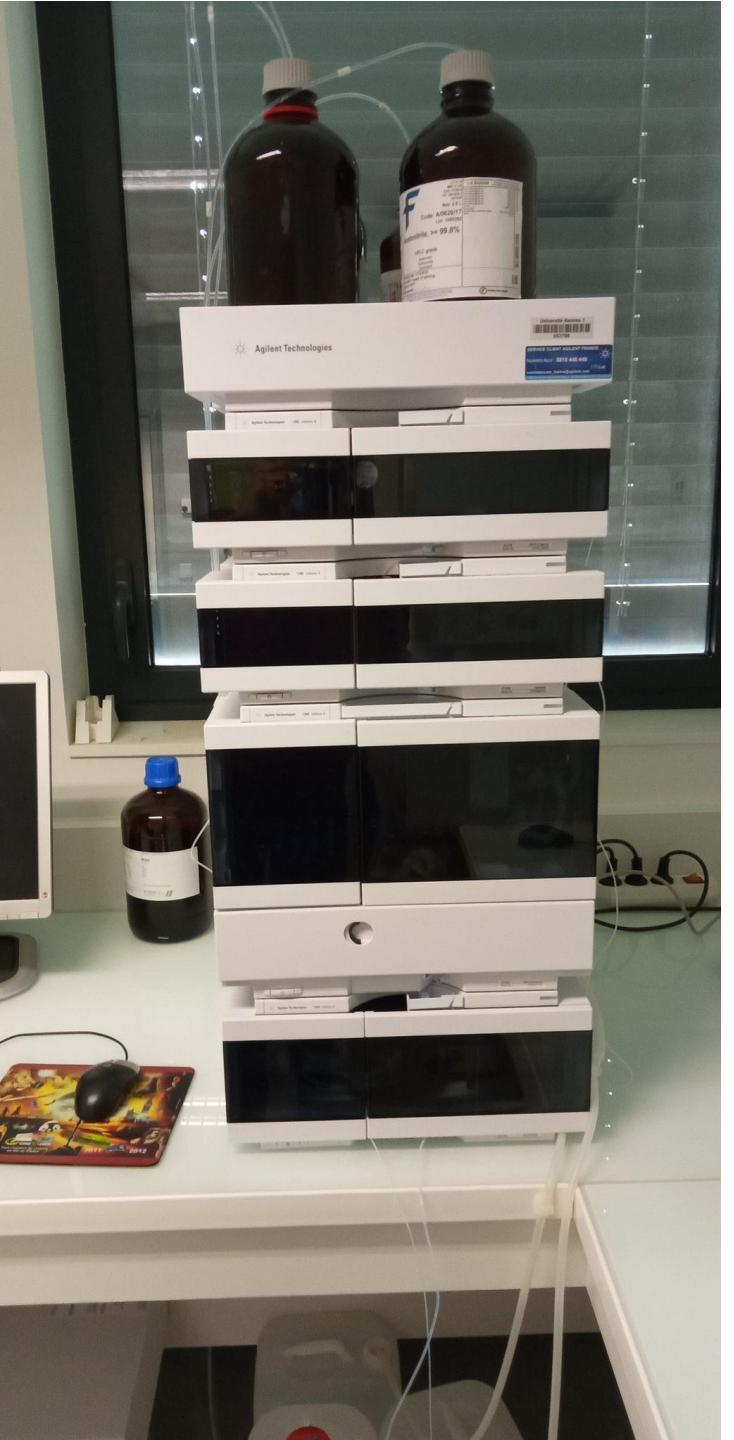


Type de résultats obtenus

- ▶ Profil HPLC, avec des pics correspondant à chaque composé détecté
- ▶ Chaque pic apparaît à un temps de rétention précis, permettant d'identifier des molécules en particulier, si comparé à des standards analytiques
- ▶ Aire sous la courbe permet une quantification du composé, en comparaison à une gamme étalon
- ▶ Les courbes sont superposables, pour comparer l'évolution des quantités d'un échantillon à l'autre

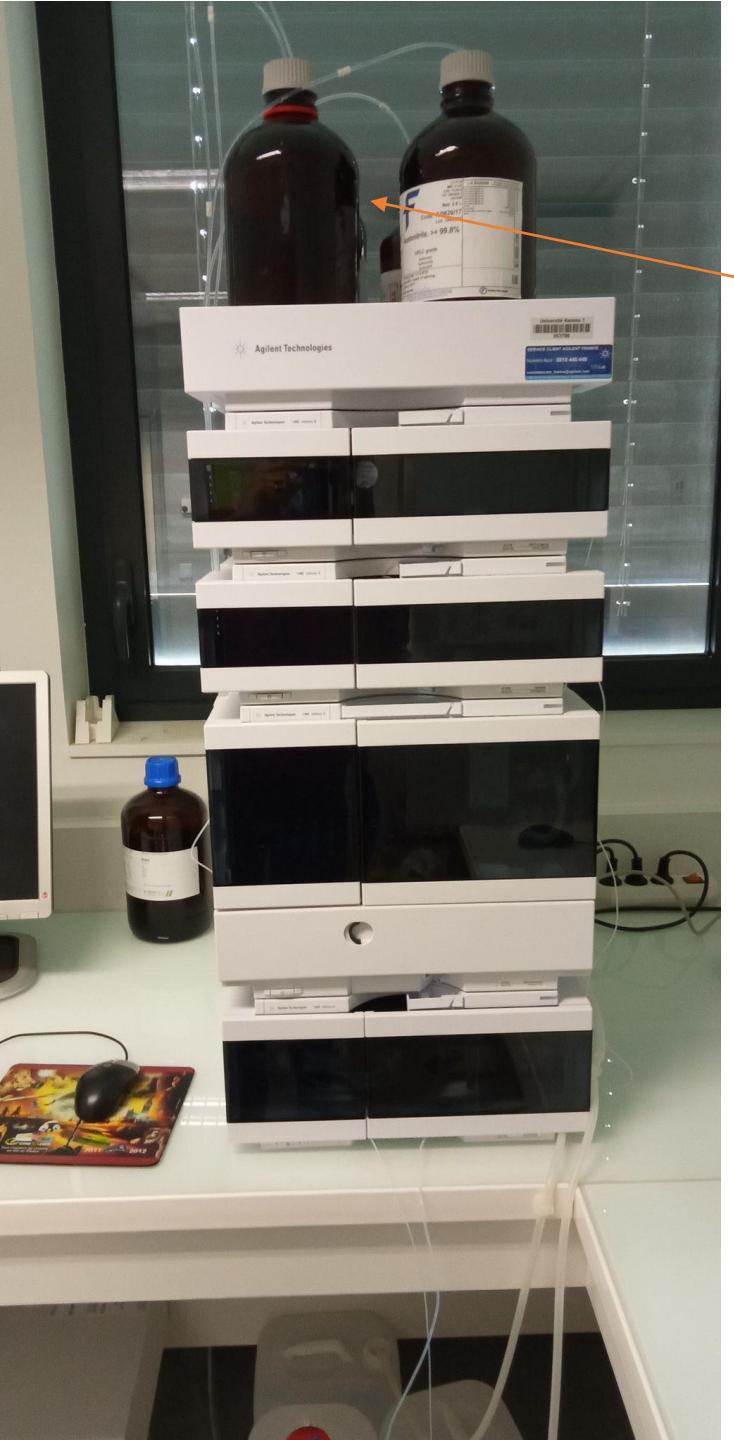


Appareil du bâtiment 7 à Villejean



Appareil du bâtiment 7 à Villejean

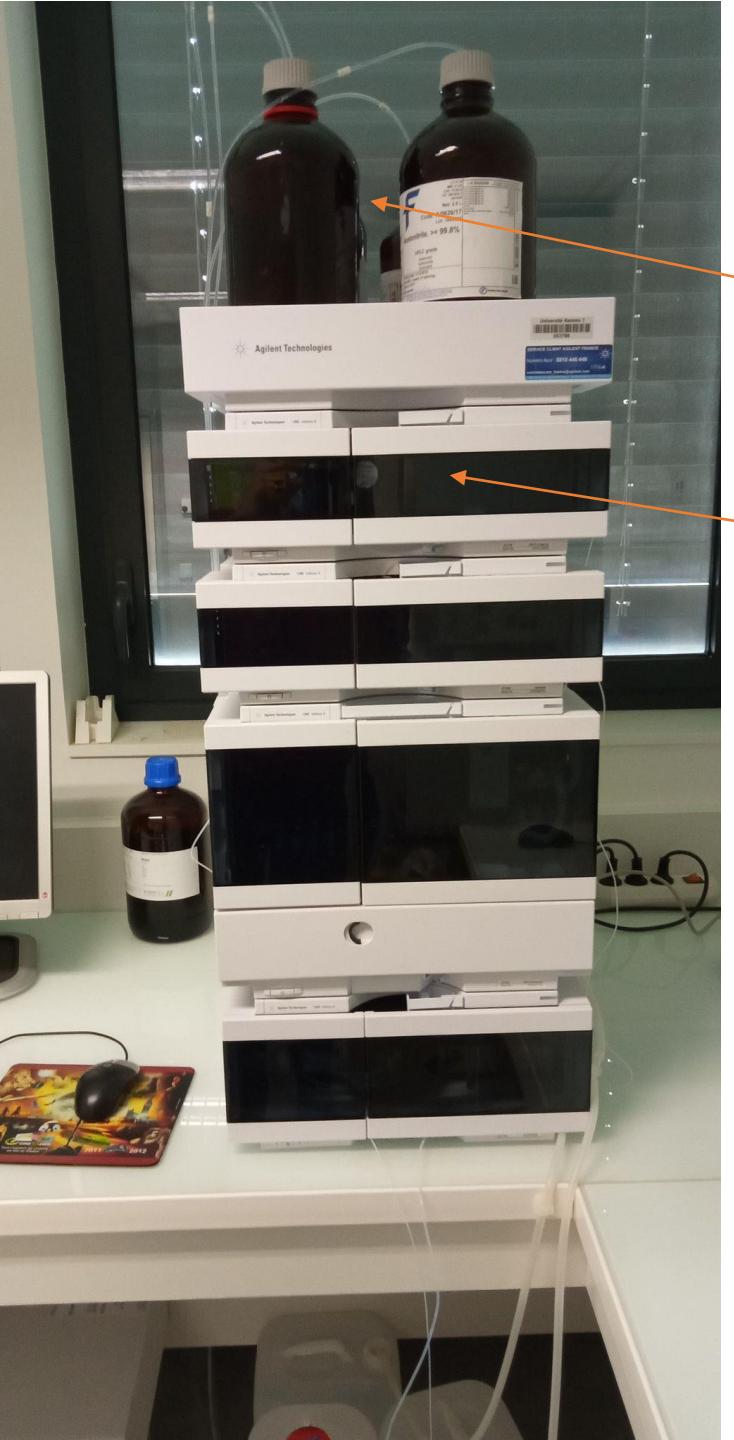
Solvants



Appareil du bâtiment 7 à Villejean

Solvants

Lecteur Fluorescence

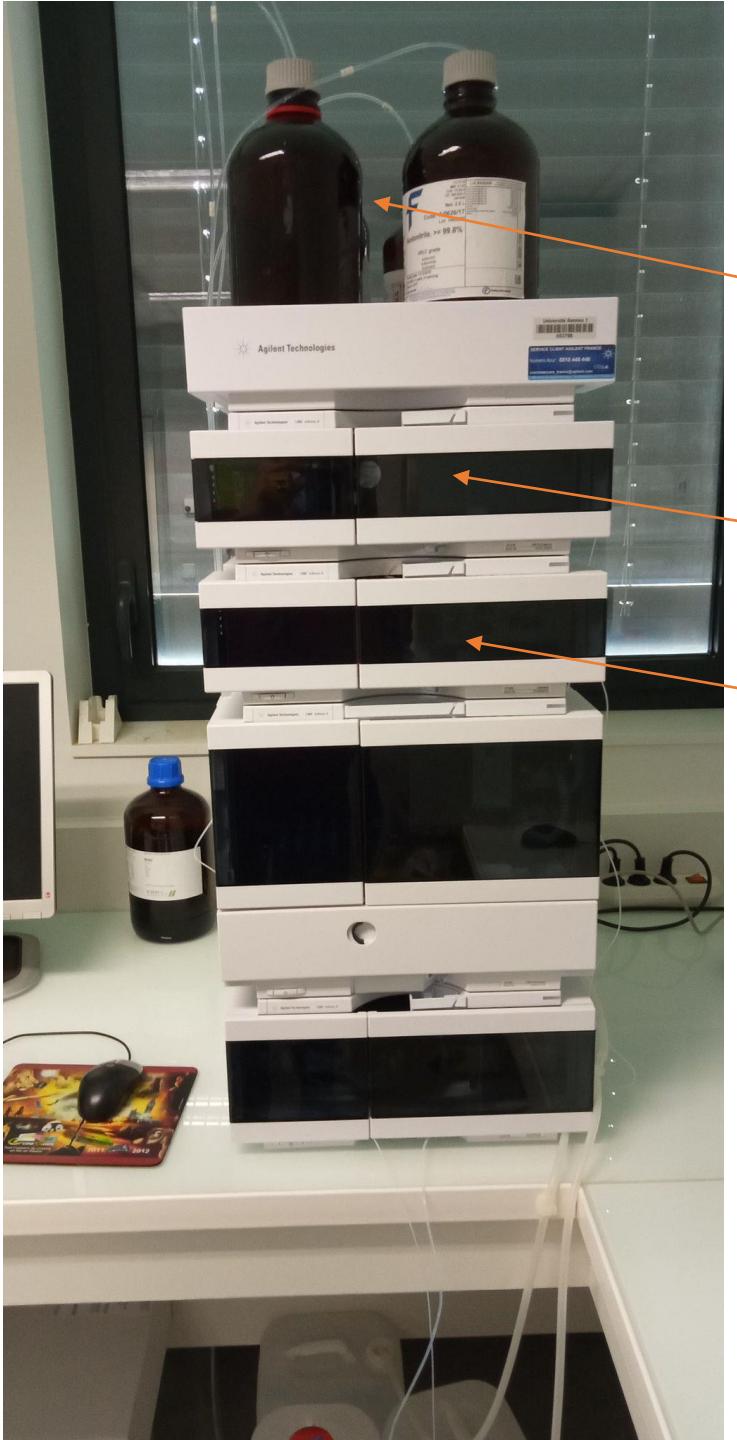


Appareil du bâtiment 7 à Villejean

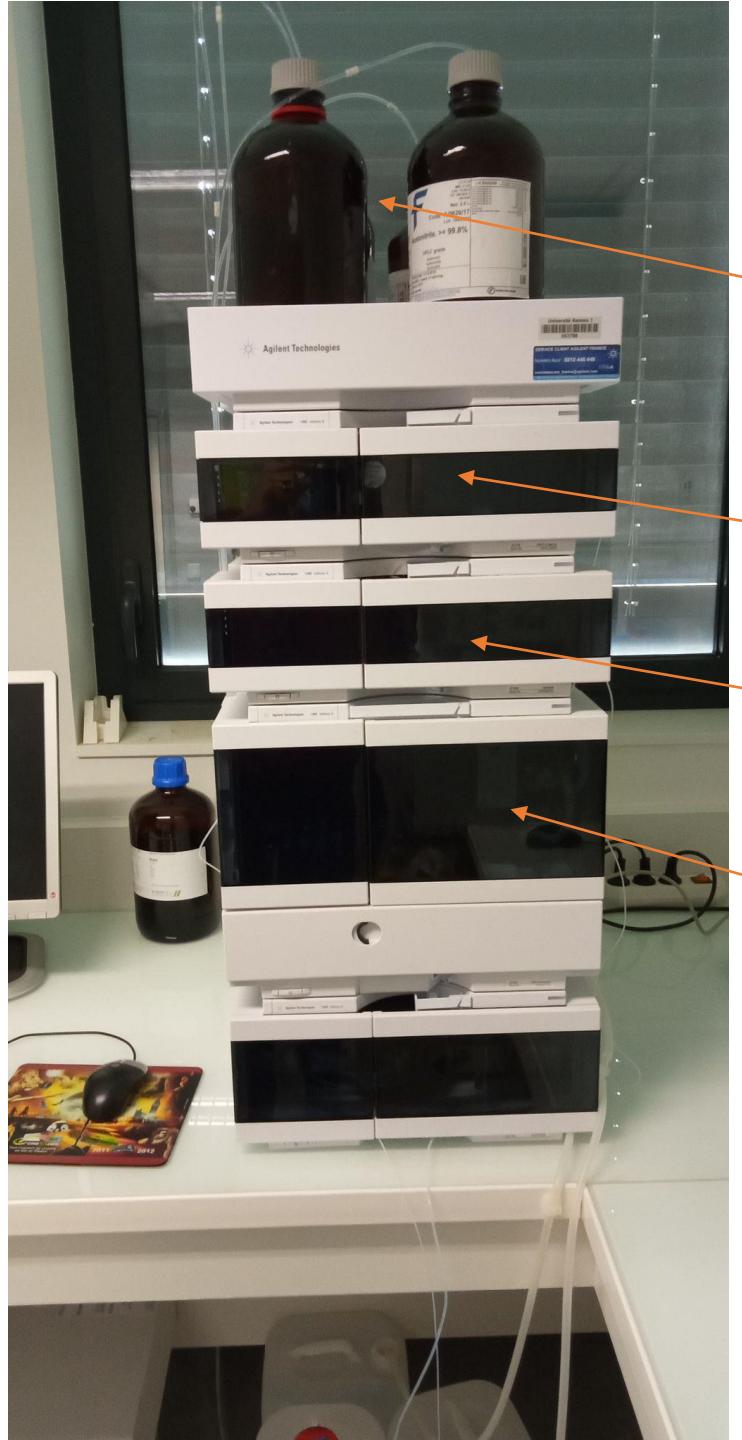
Solvants

Lecteur Fluorescence

Lecteur UV



Appareil du bâtiment 7 à Villejean



Solvants

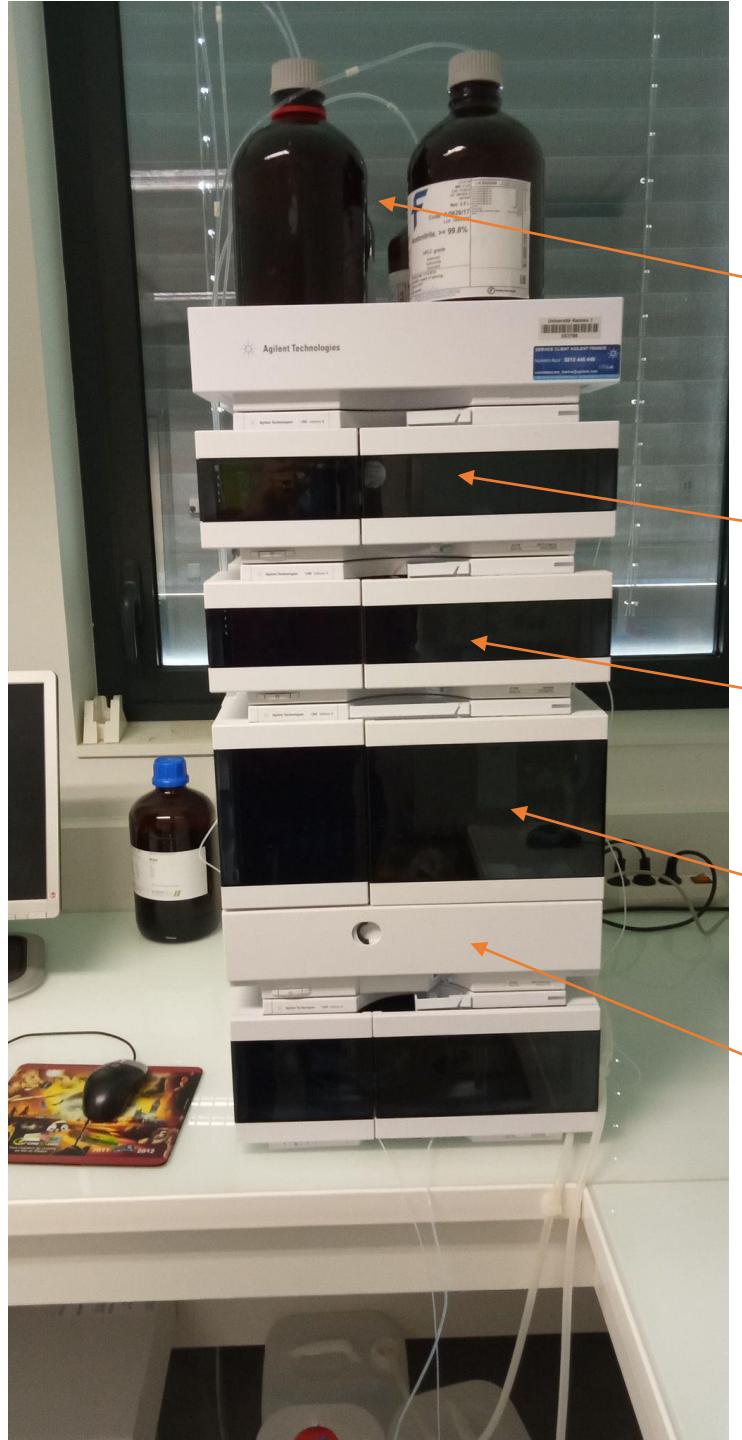
Lecteur Fluorescence

Lecteur UV

Echantillons +
bras Injecteur



Appareil du bâtiment 7 à Villejean



Solvants

Lecteur Fluorescence

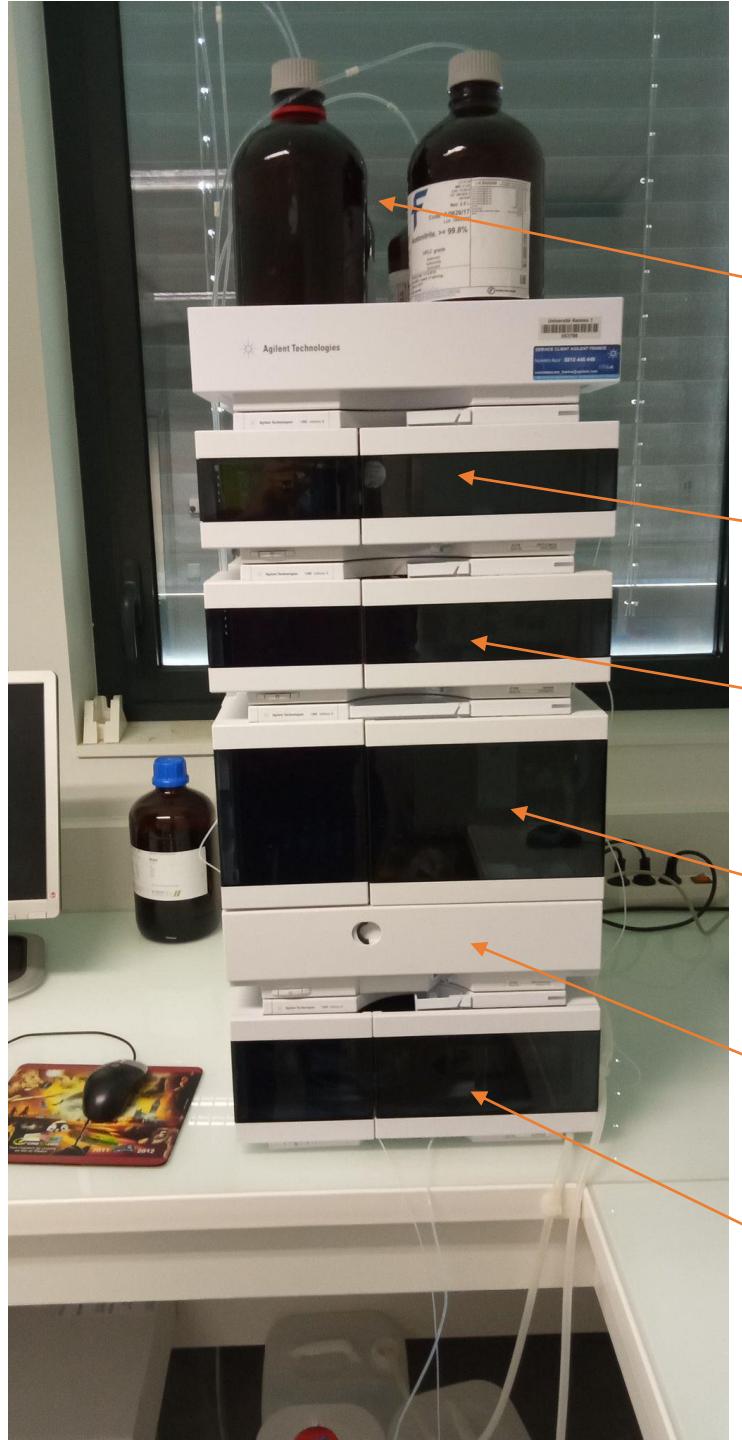
Lecteur UV

Echantillons +
bras Injecteur

Four + colonne



Appareil du bâtiment 7 à Villejean



Solvants

Lecteur Fluorescence

Lecteur UV

Echantillons +
bras Injecteur

Four + colonne

Pompe + purge



Pompe, mélangeur et purge



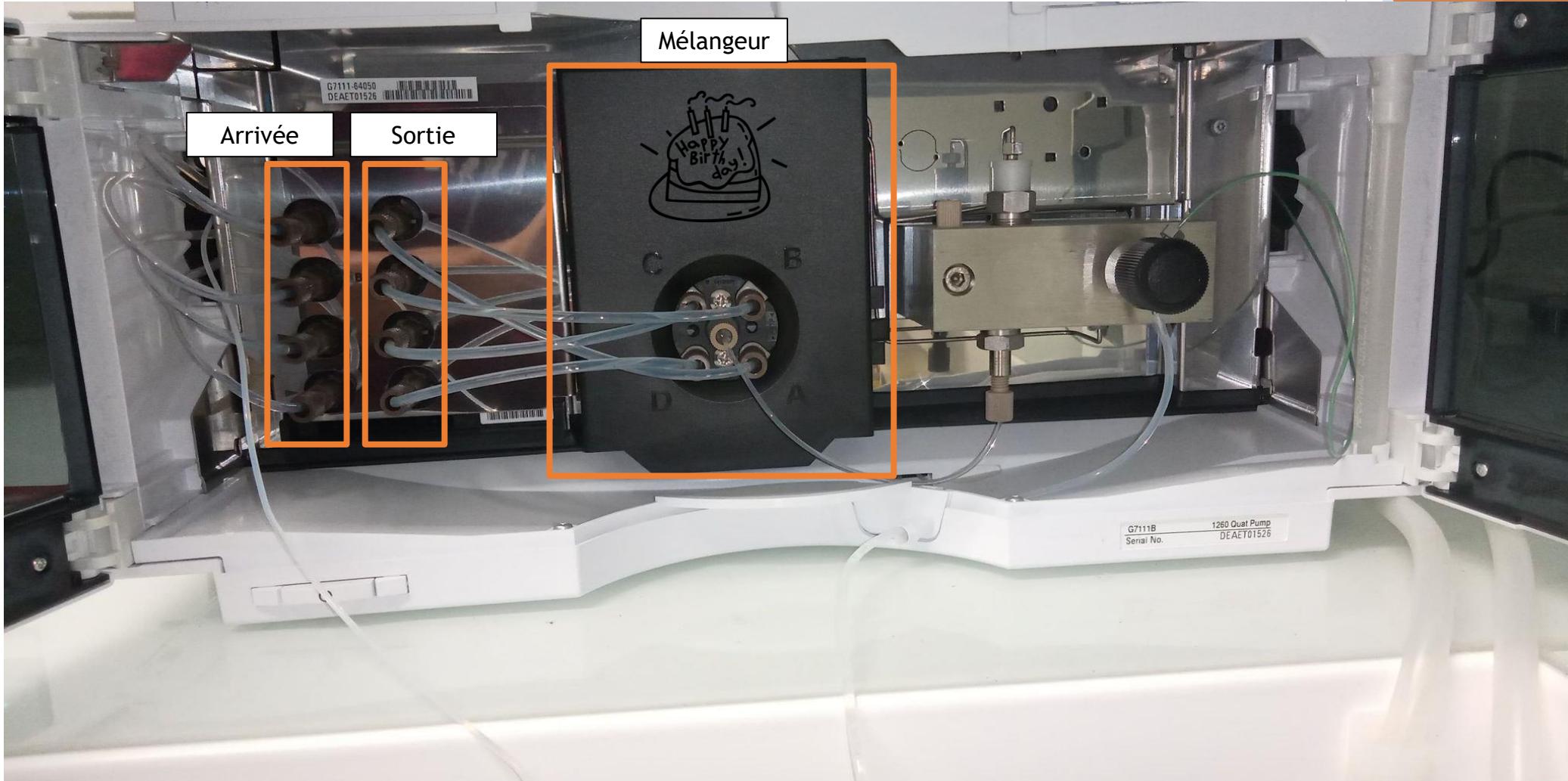
Pompe, mélangeur et purge



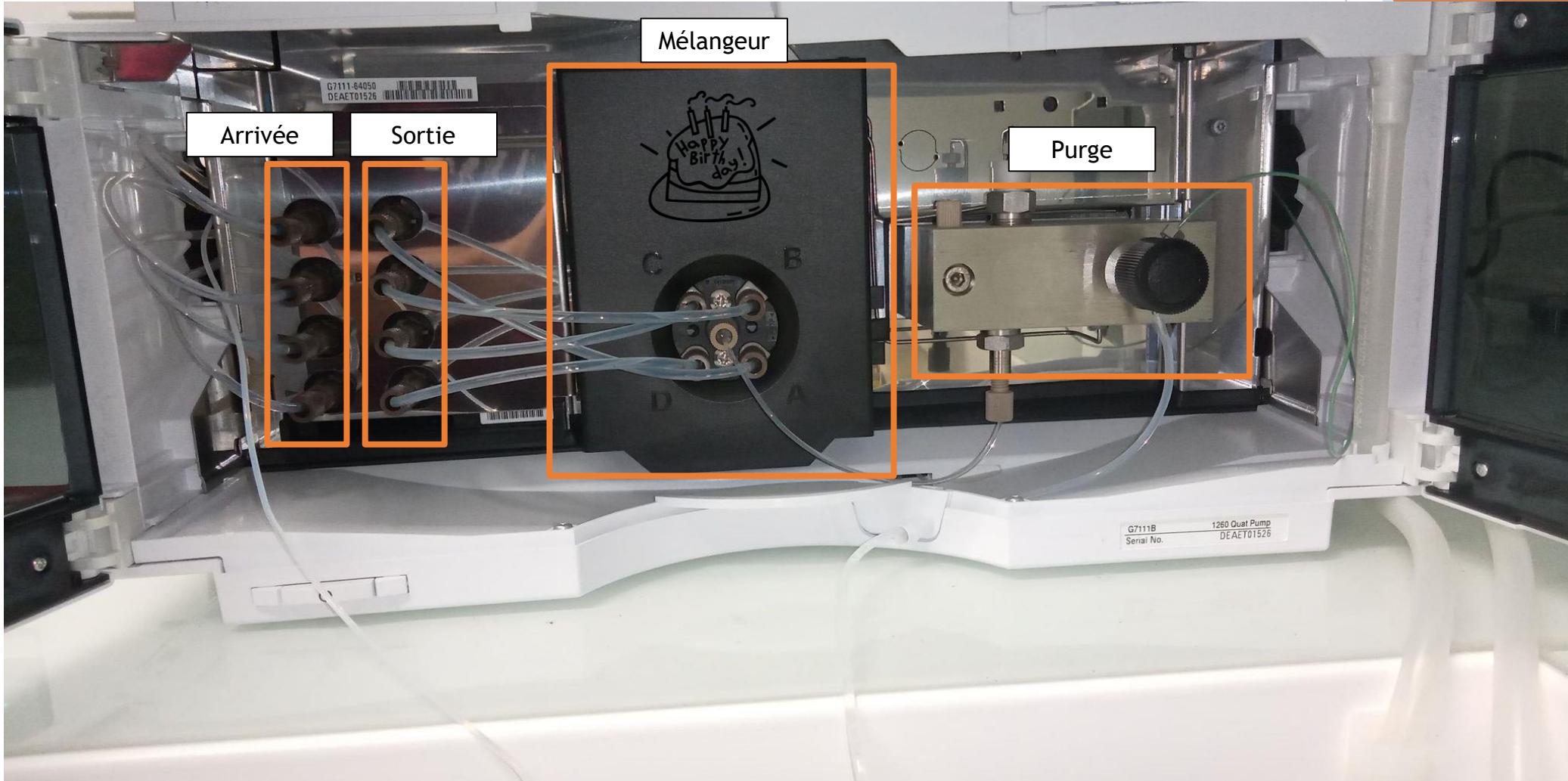
Pompe, mélangeur et purge



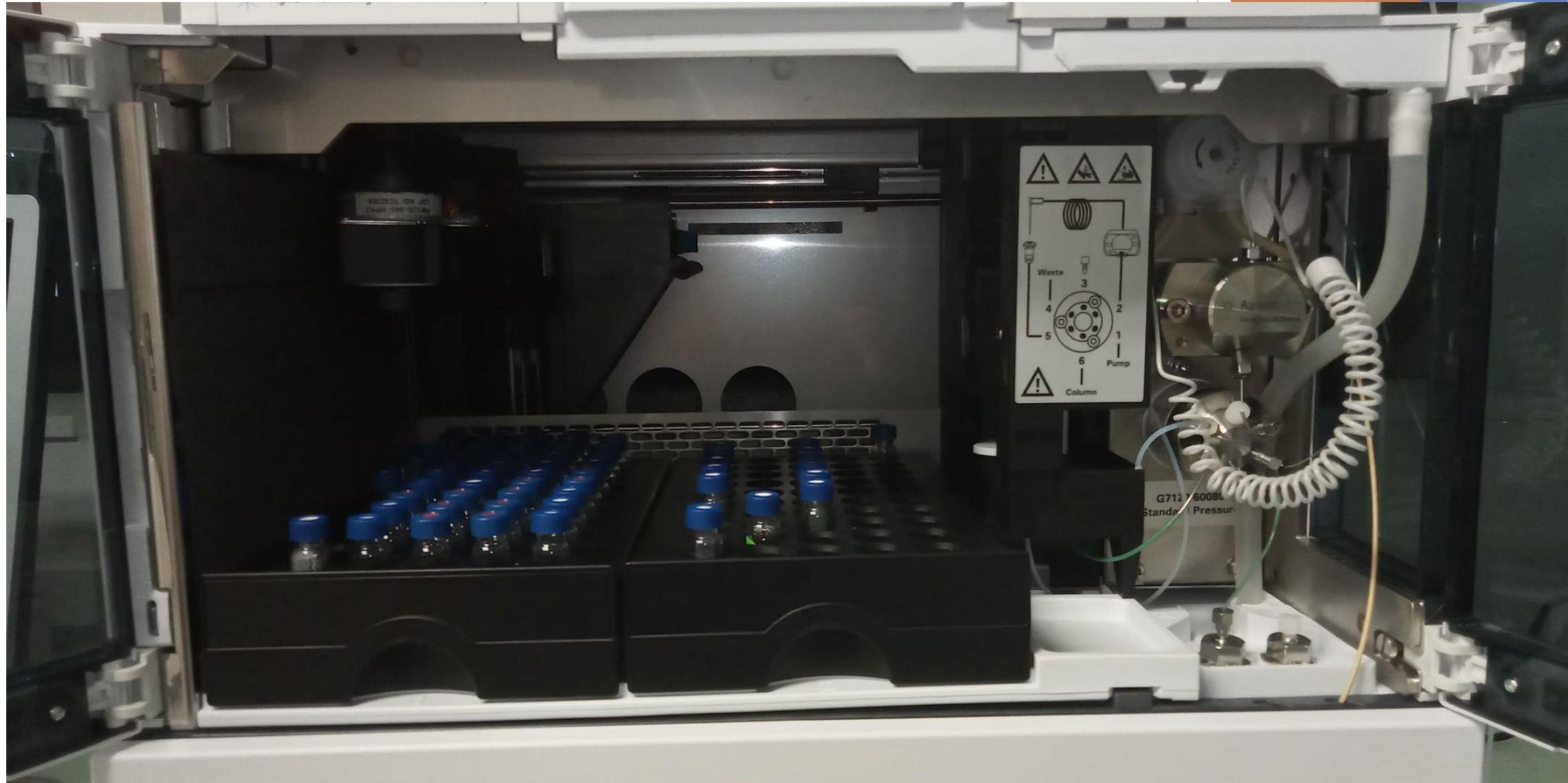
Pompe, mélangeur et purge



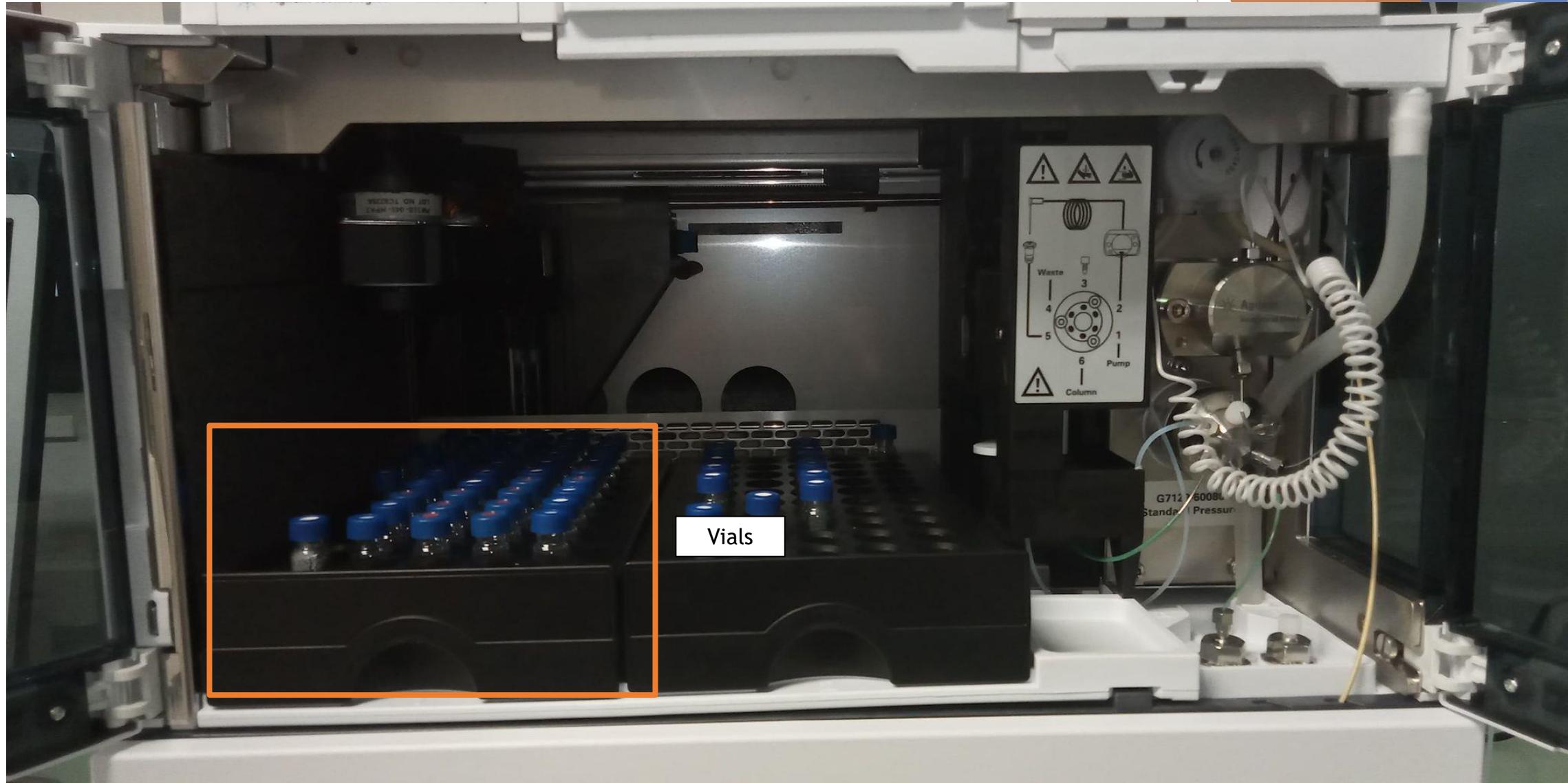
Pompe, mélangeur et purge



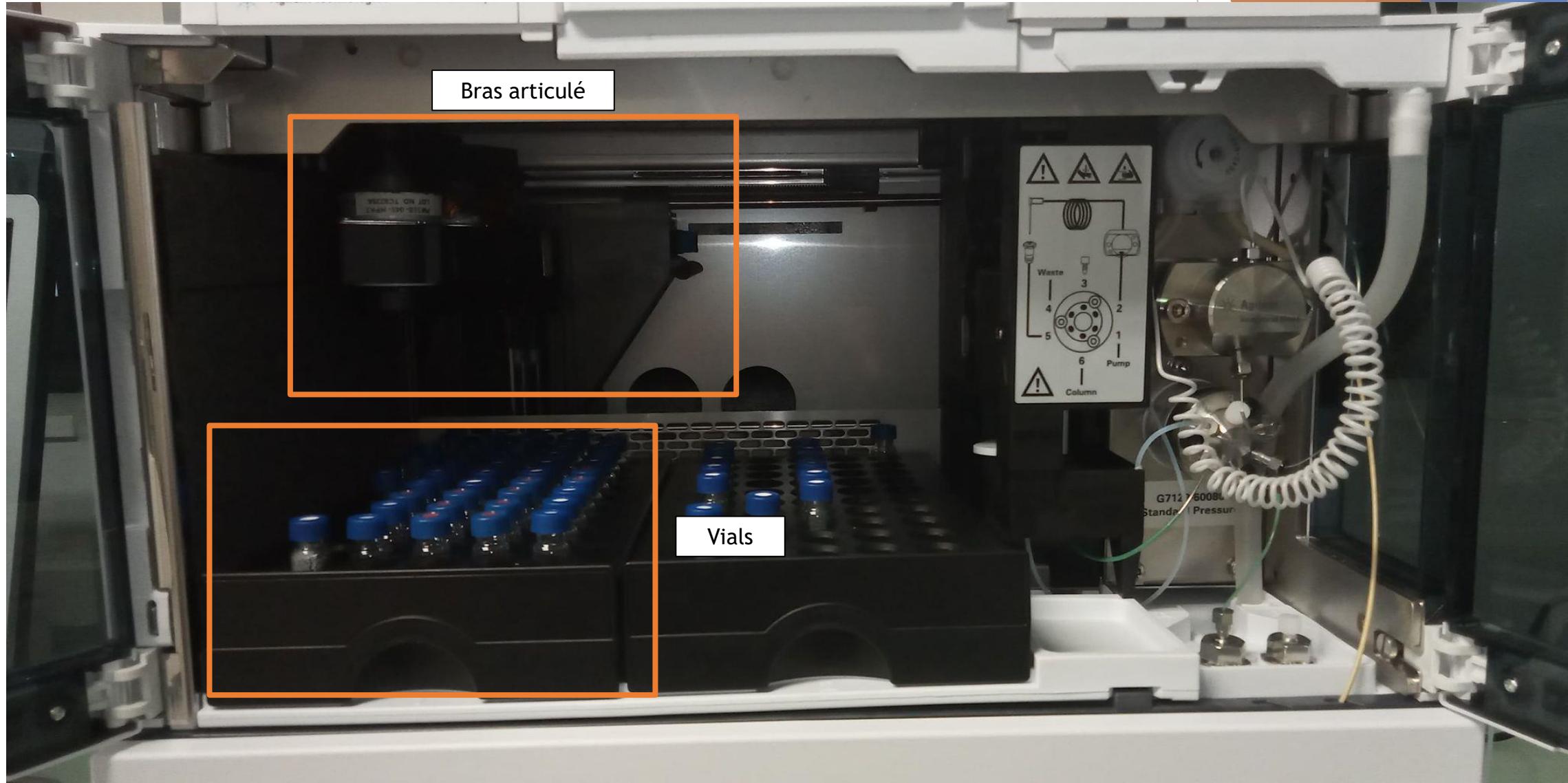
Rack d'échantillons et bras injecteur



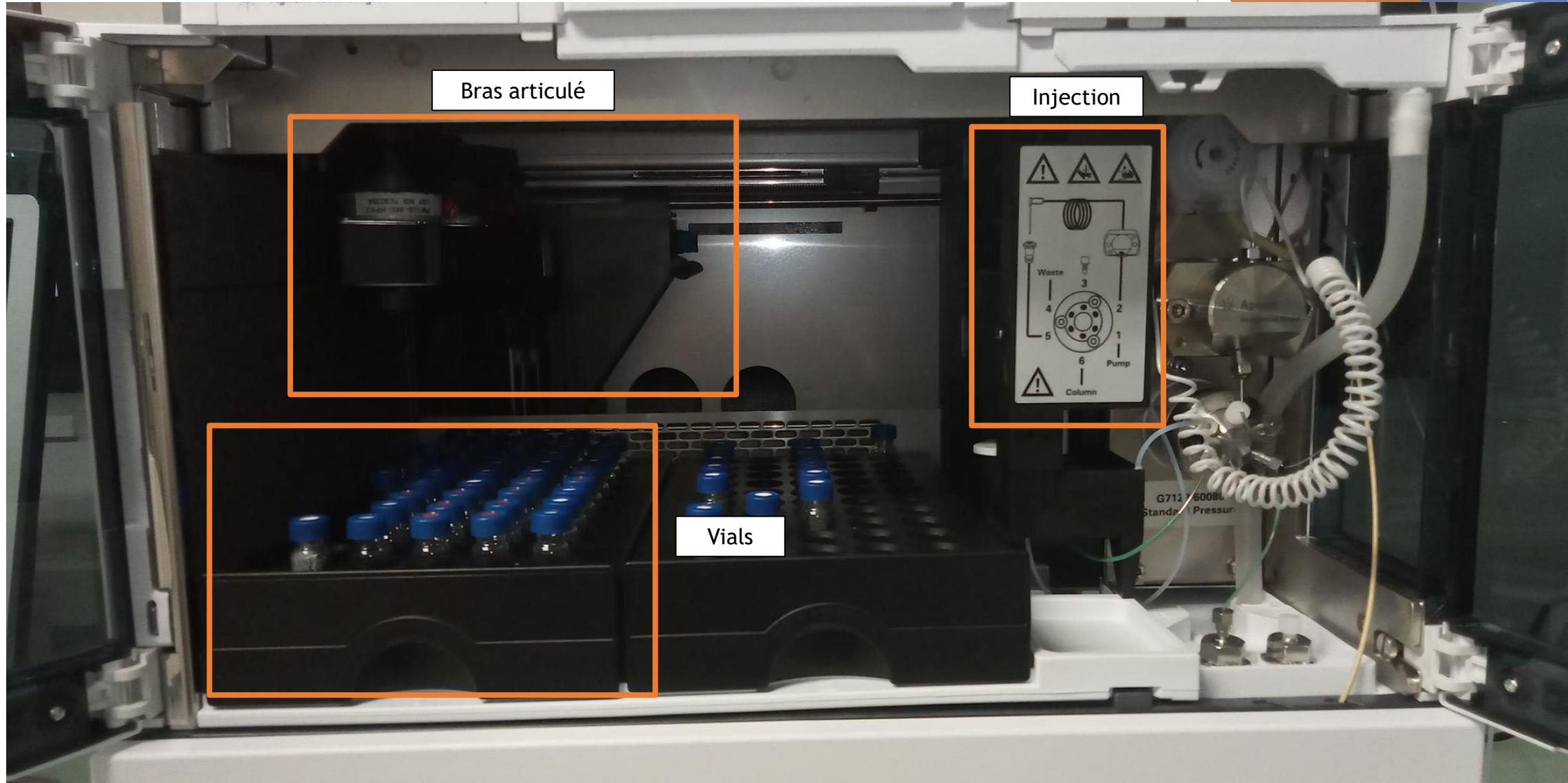
Rack d'échantillons et bras injecteur



Rack d'échantillons et bras injecteur



Rack d'échantillons et bras injecteur



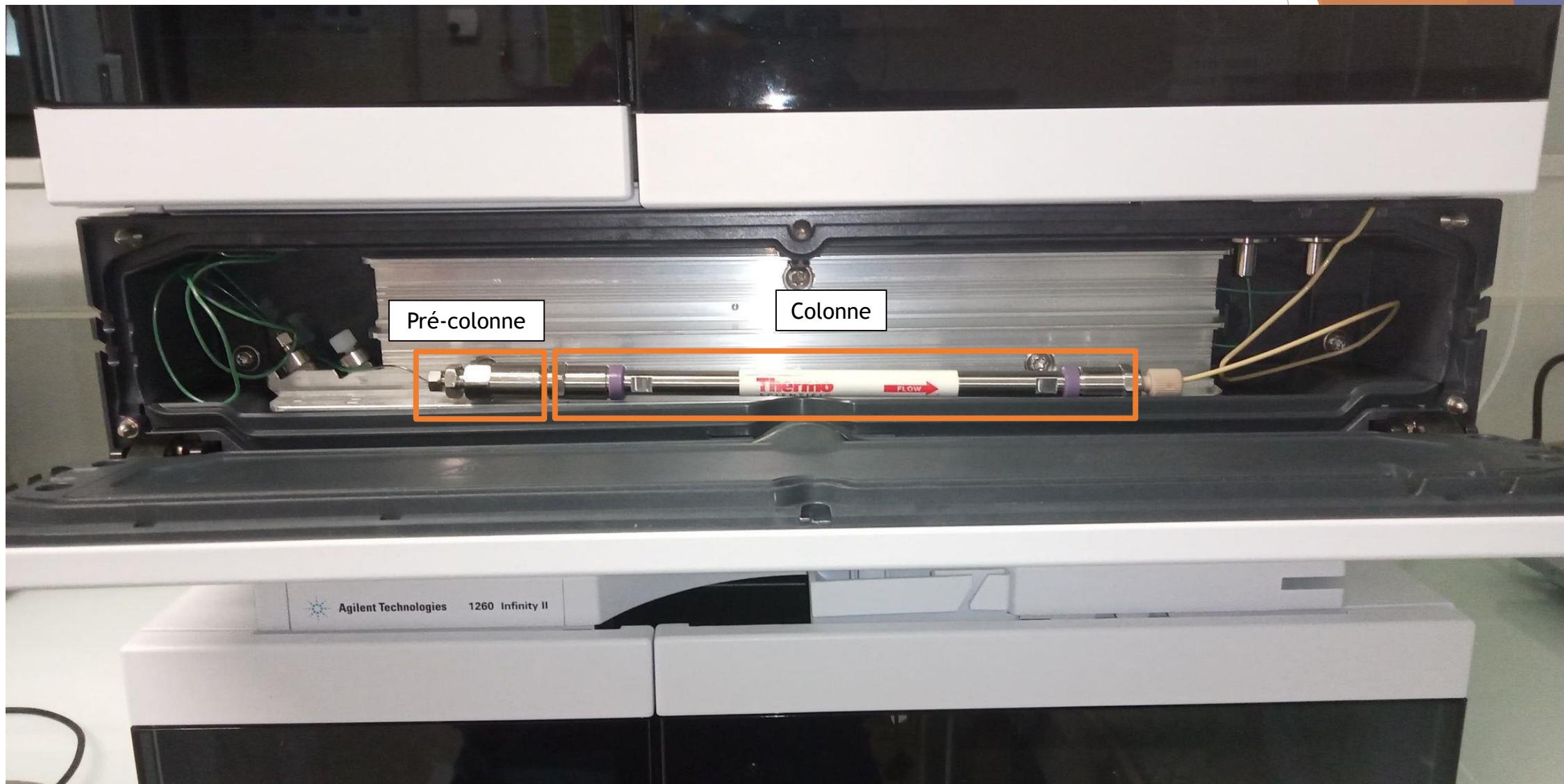
Colonne et four



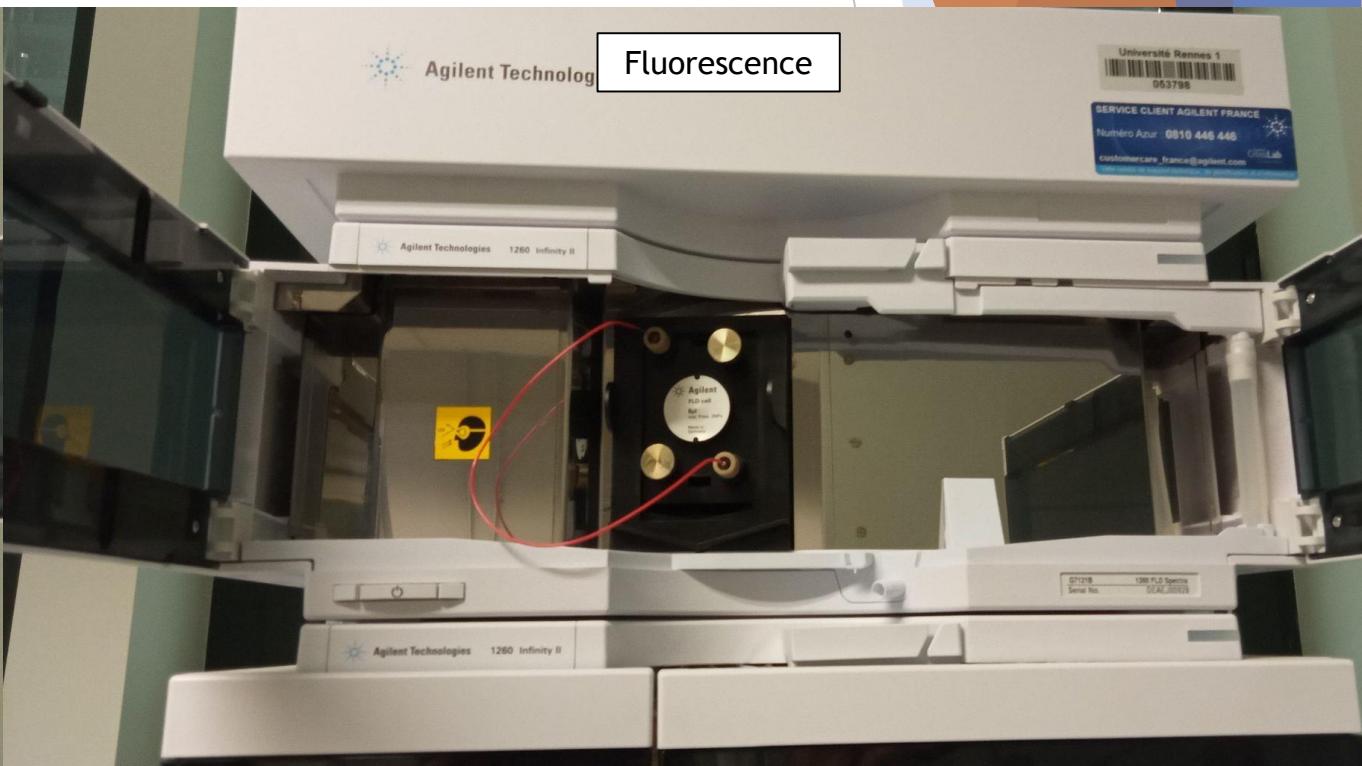
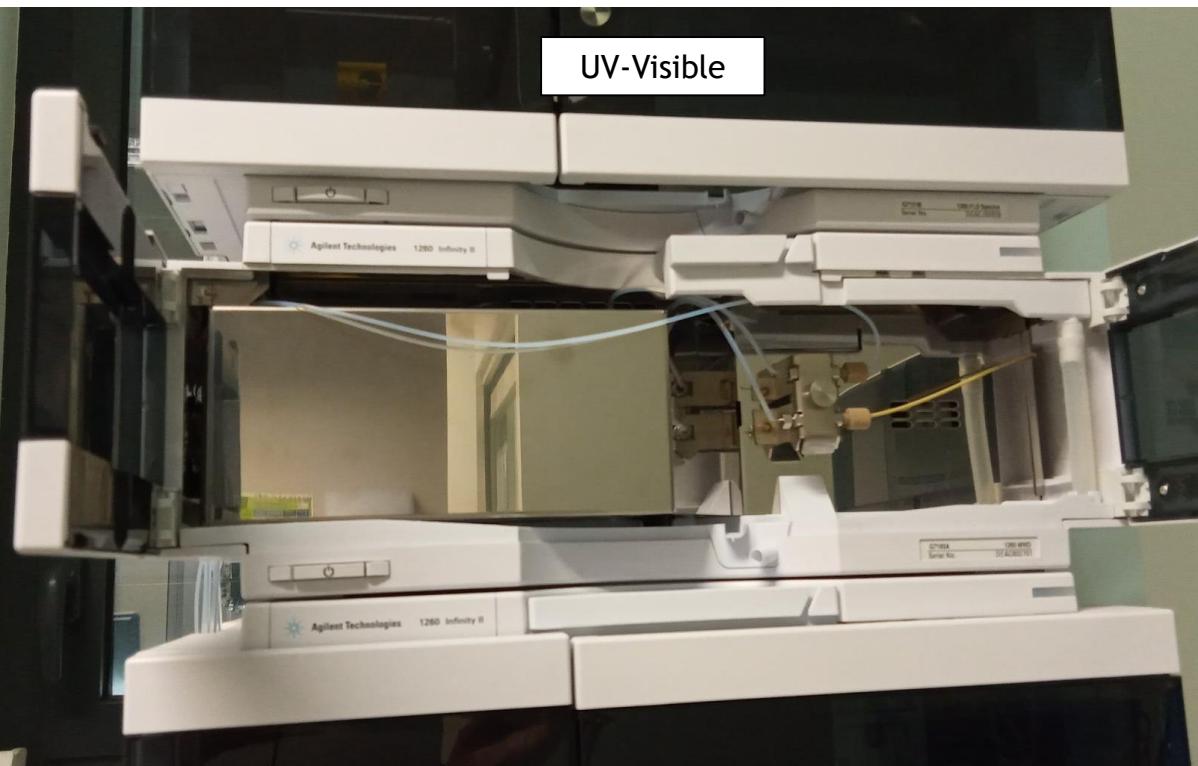
Colonne et four



Colonne et four



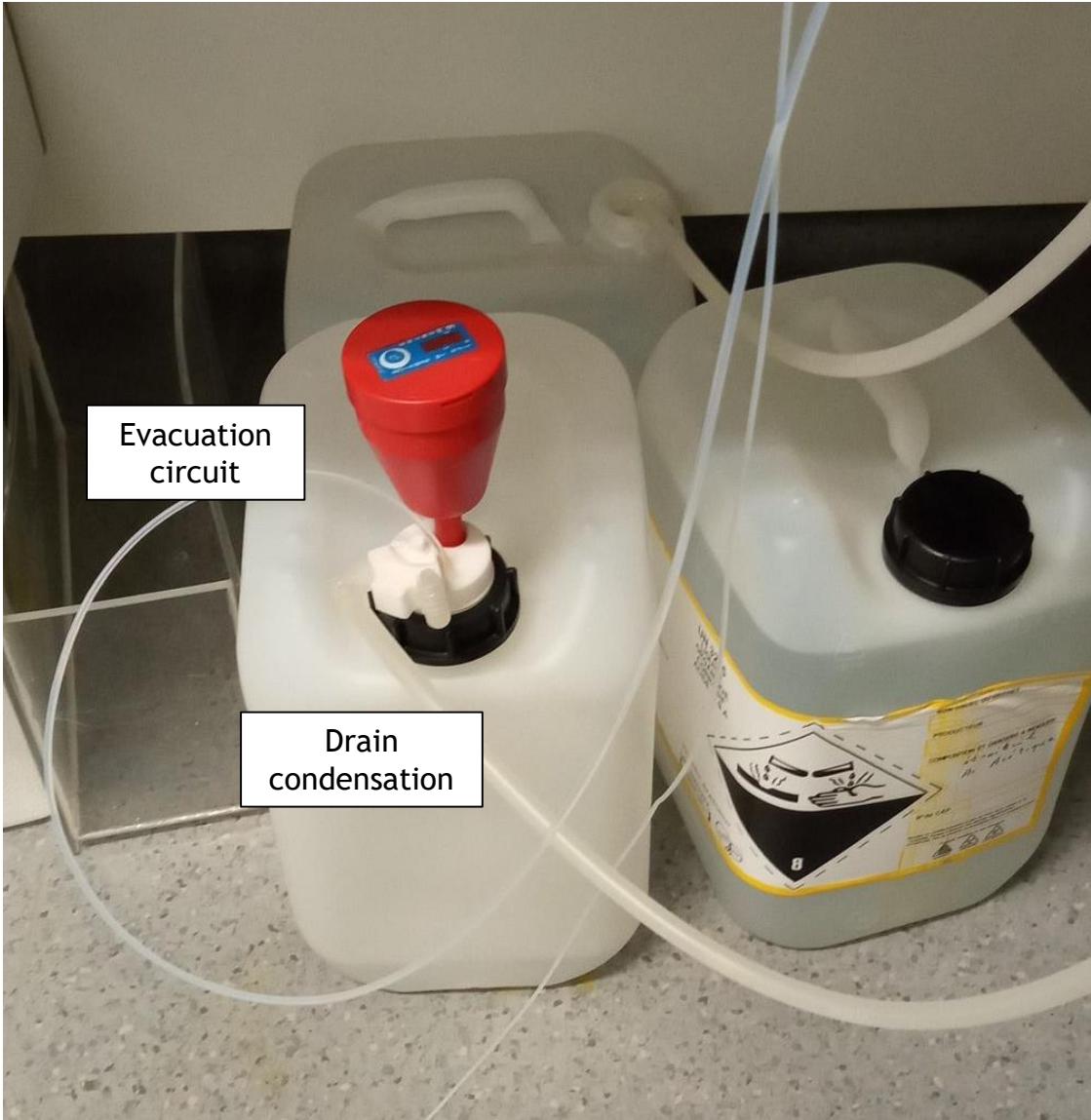
Lecteurs optiques (Ultraviolet et Fluorescence)



Poubelle

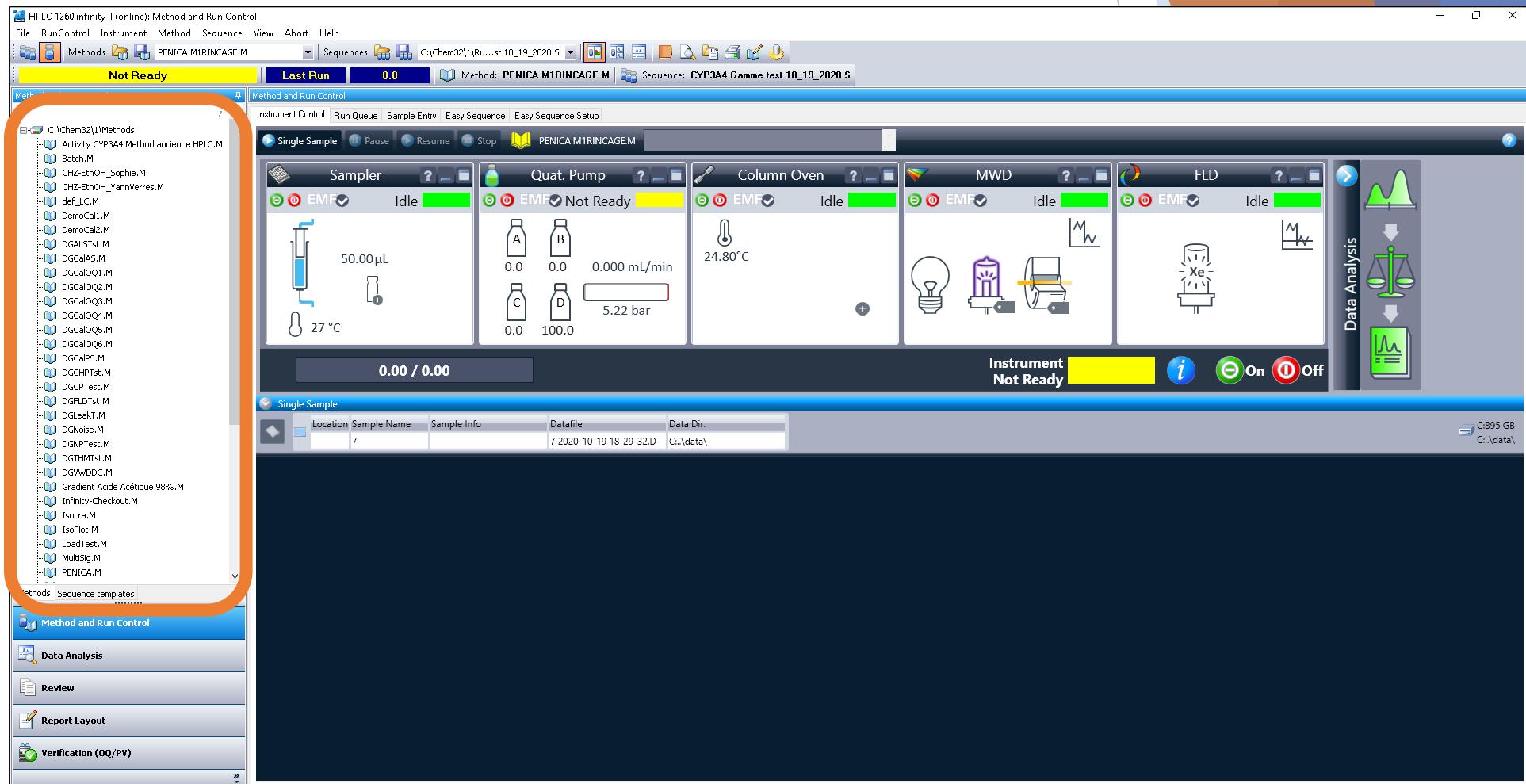


Poubelle



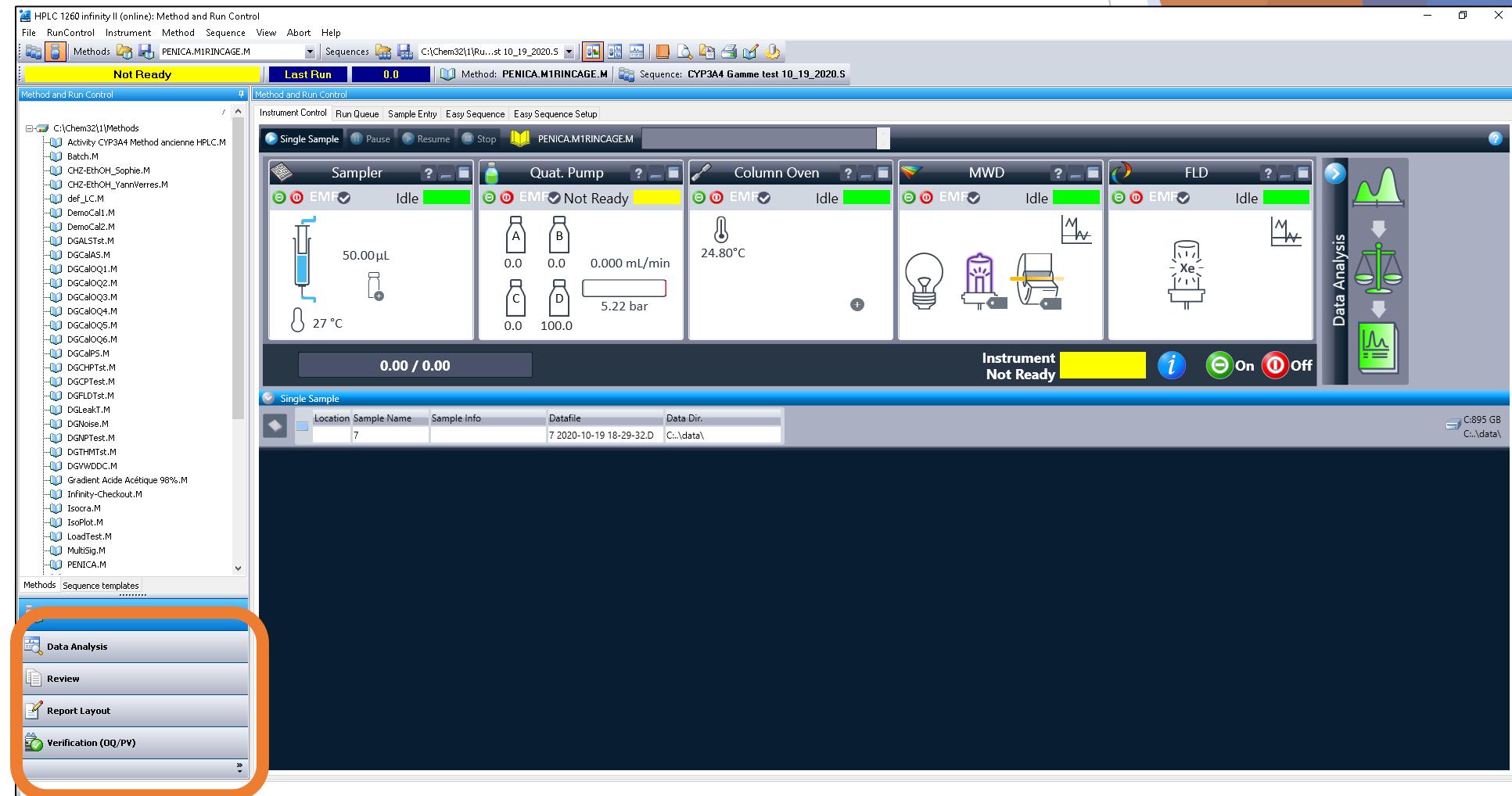
Interface « Online » du logiciel HPLC

Liste des protocoles



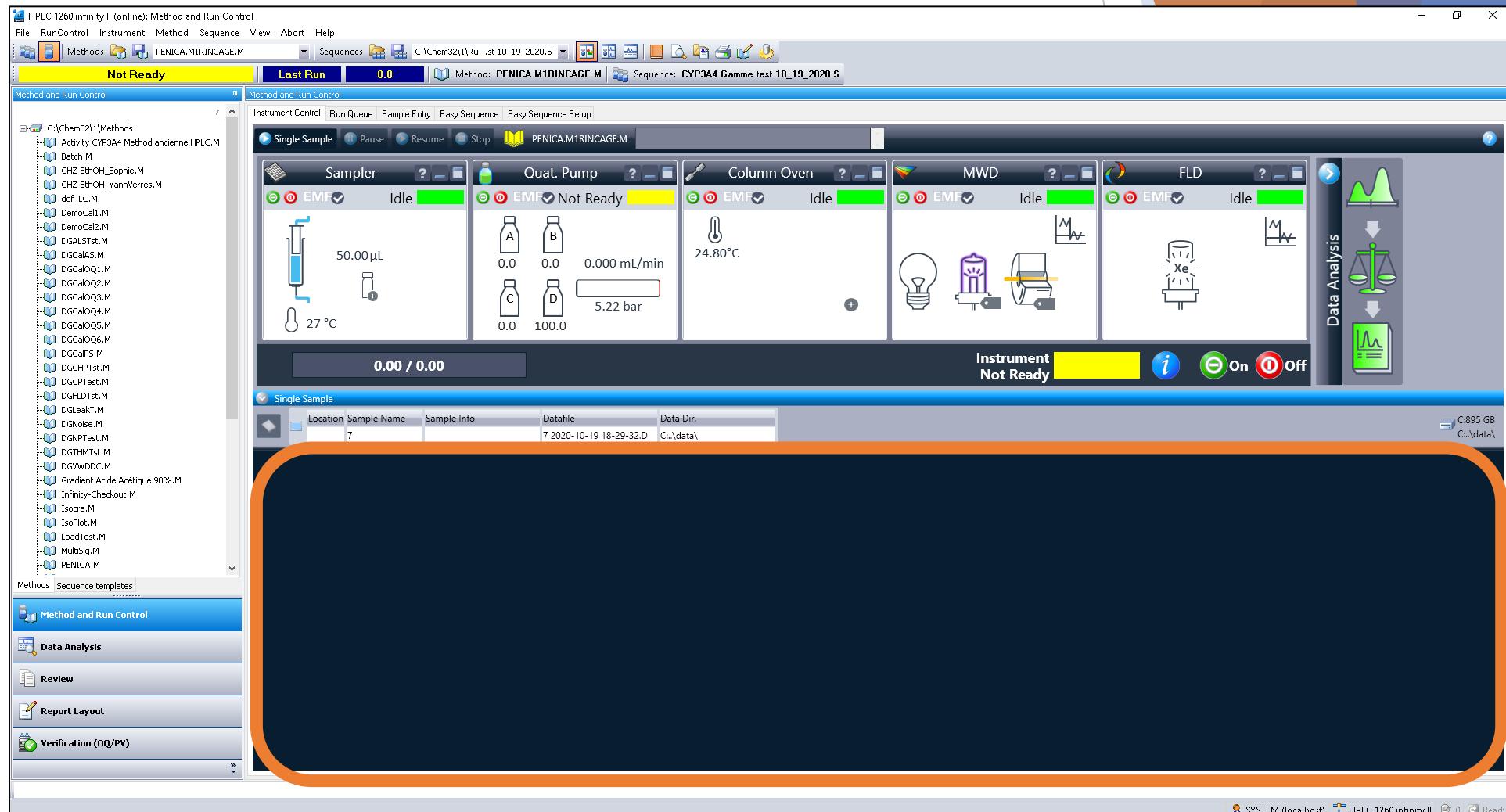
Interface « Online » du logiciel HPLC

Onglets d'analyse



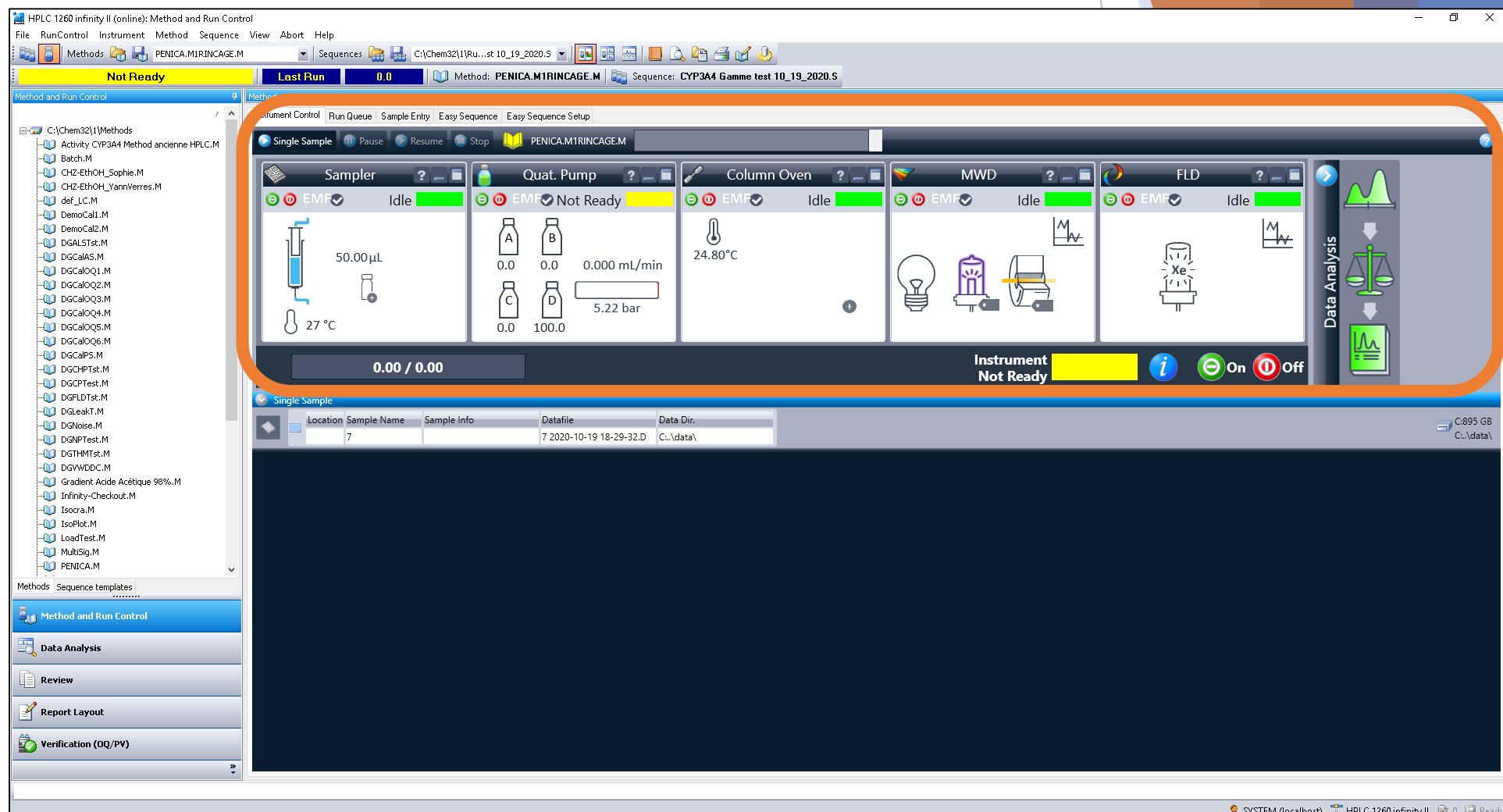
Interface « Online » du logiciel HPLC

Affichage de la lecture en cours



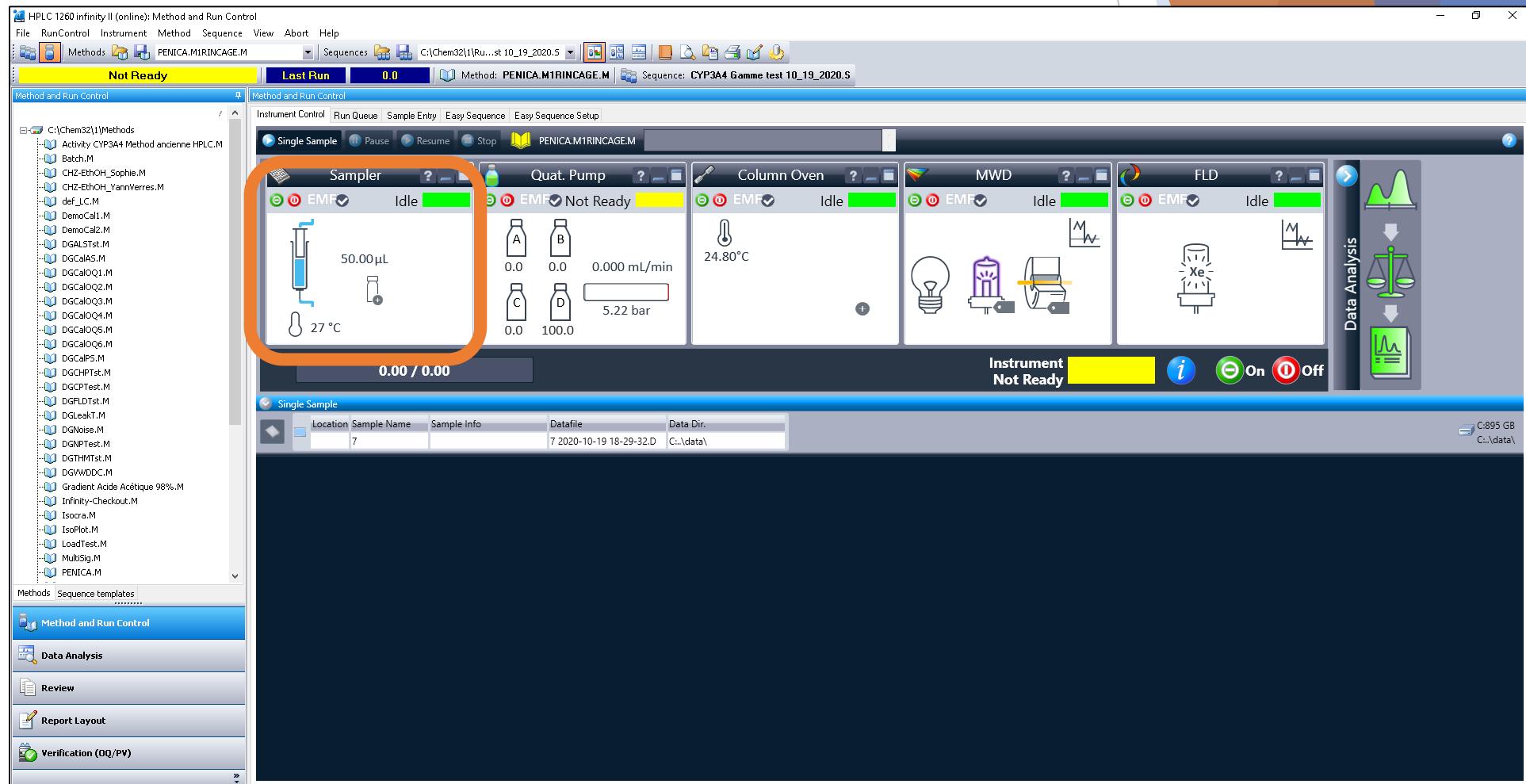
Interface « Online » du logiciel HPLC

Contrôle de l'appareil,
création de protocole



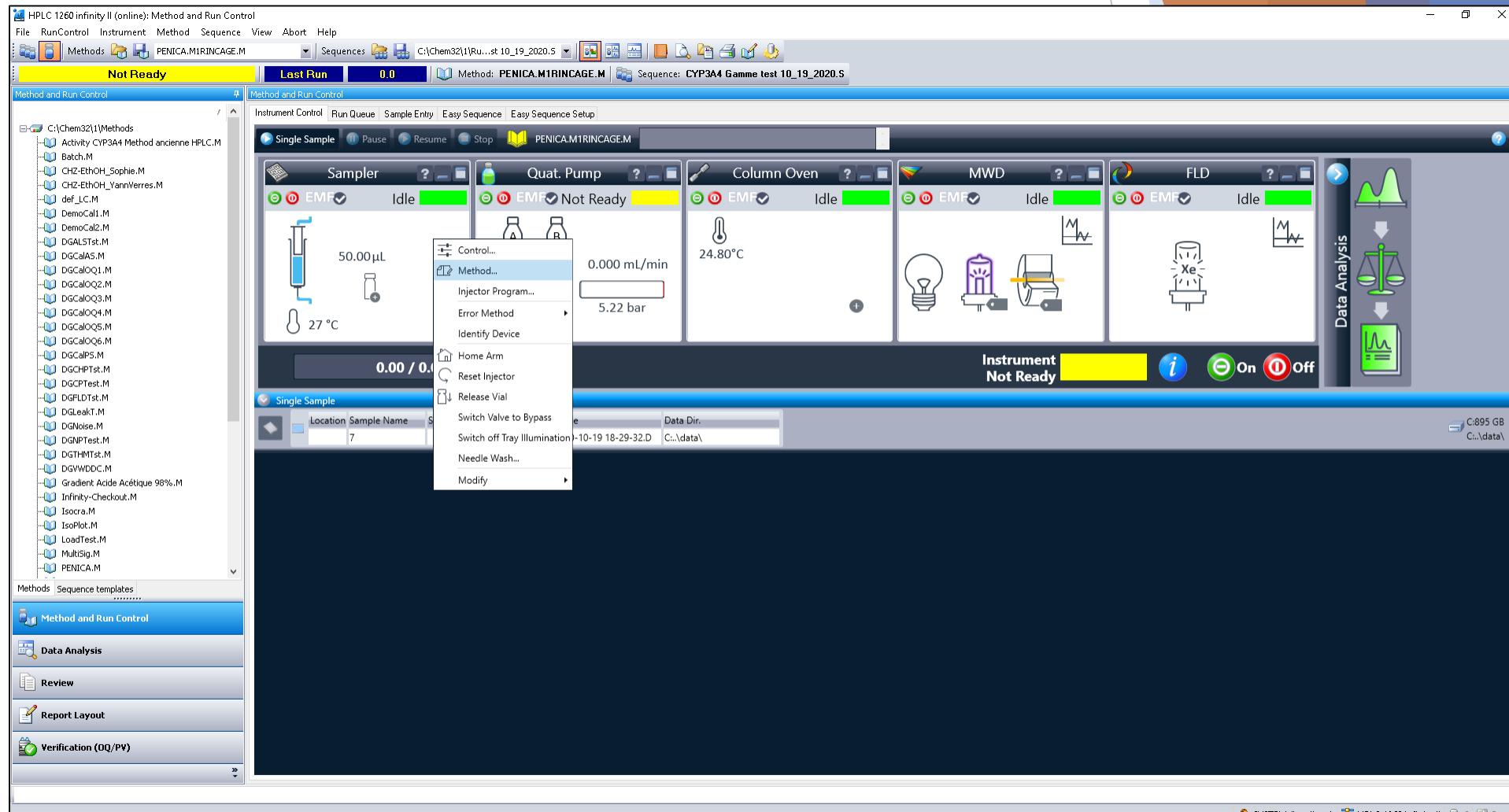
Interface « Online » du logiciel HPLC

Echantillons et injecteur



Interface « Online » du logiciel HPLC

Echantillons et injecteur

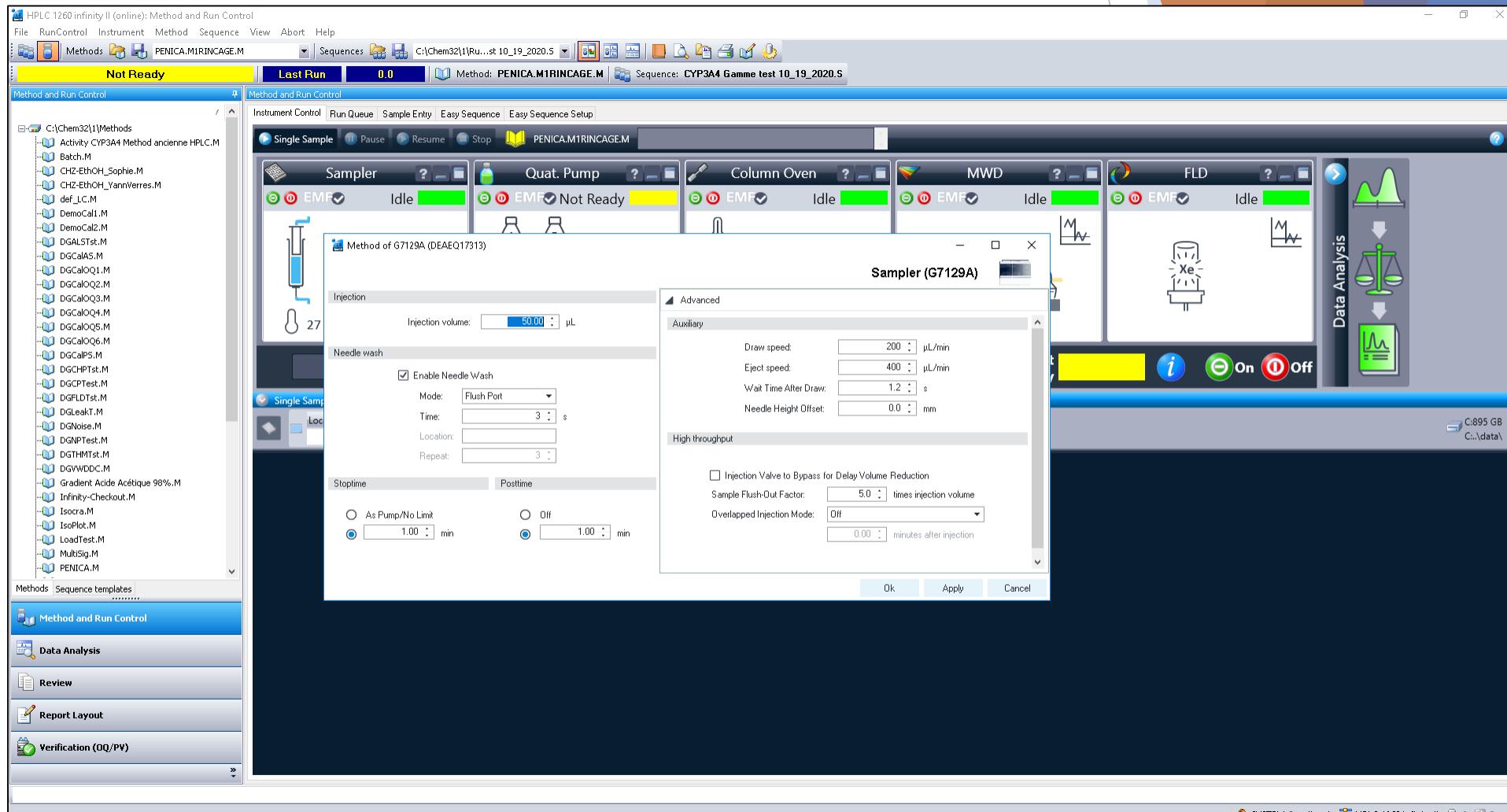


Interface « Online » du logiciel HPLC

Echantillons et injecteur

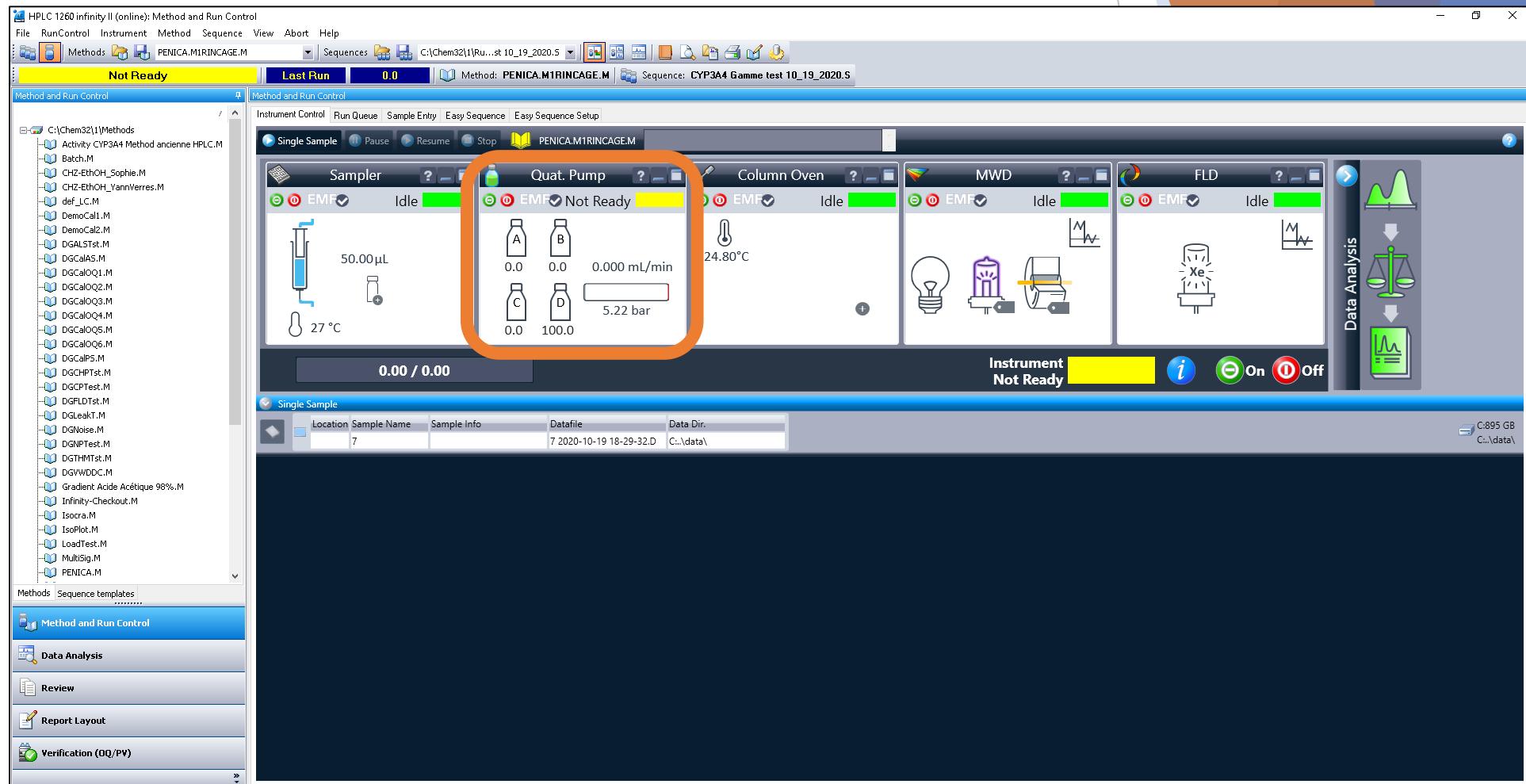
-Volume d'injection

-Stop time



Interface « Online » du logiciel HPLC

Solvants et pompe



Interface « Online » du logiciel HPLC

Solvants et pompe

-Solvants utilisés

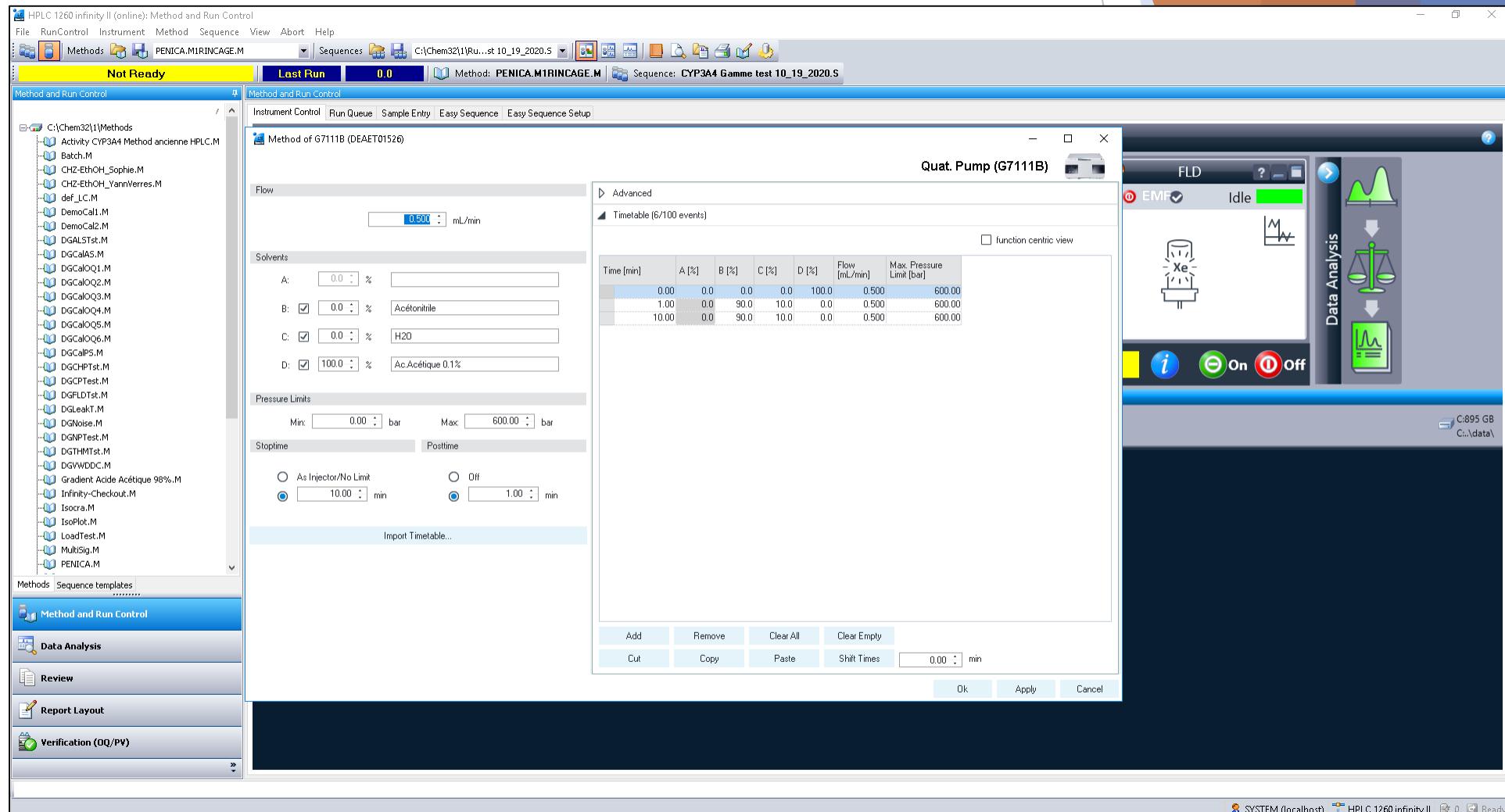
-% des solvants

-Temps de chaque phase

-Débit

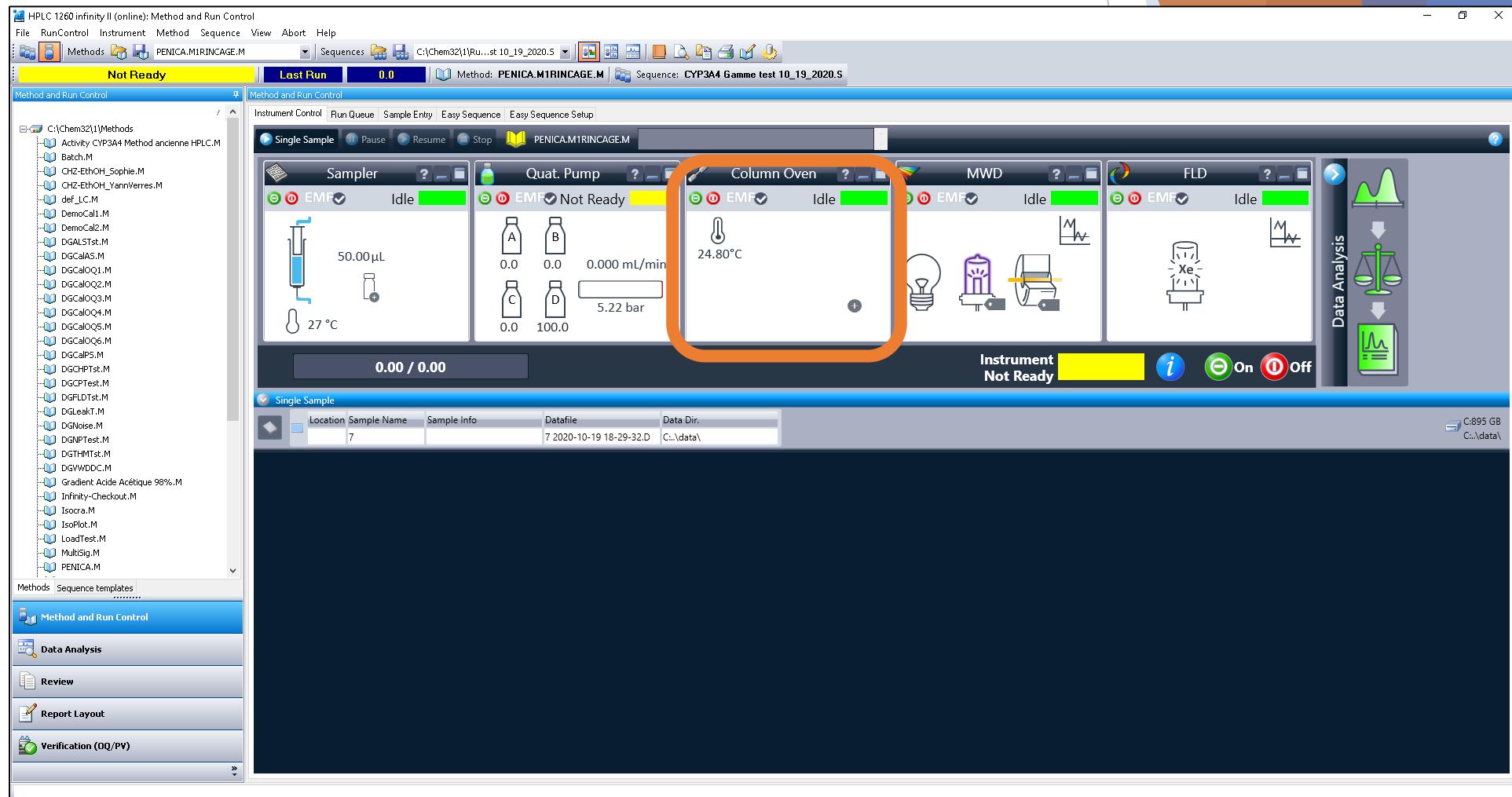
-Pression max

-Stop time



Interface « Online » du logiciel HPLC

Colonne et four

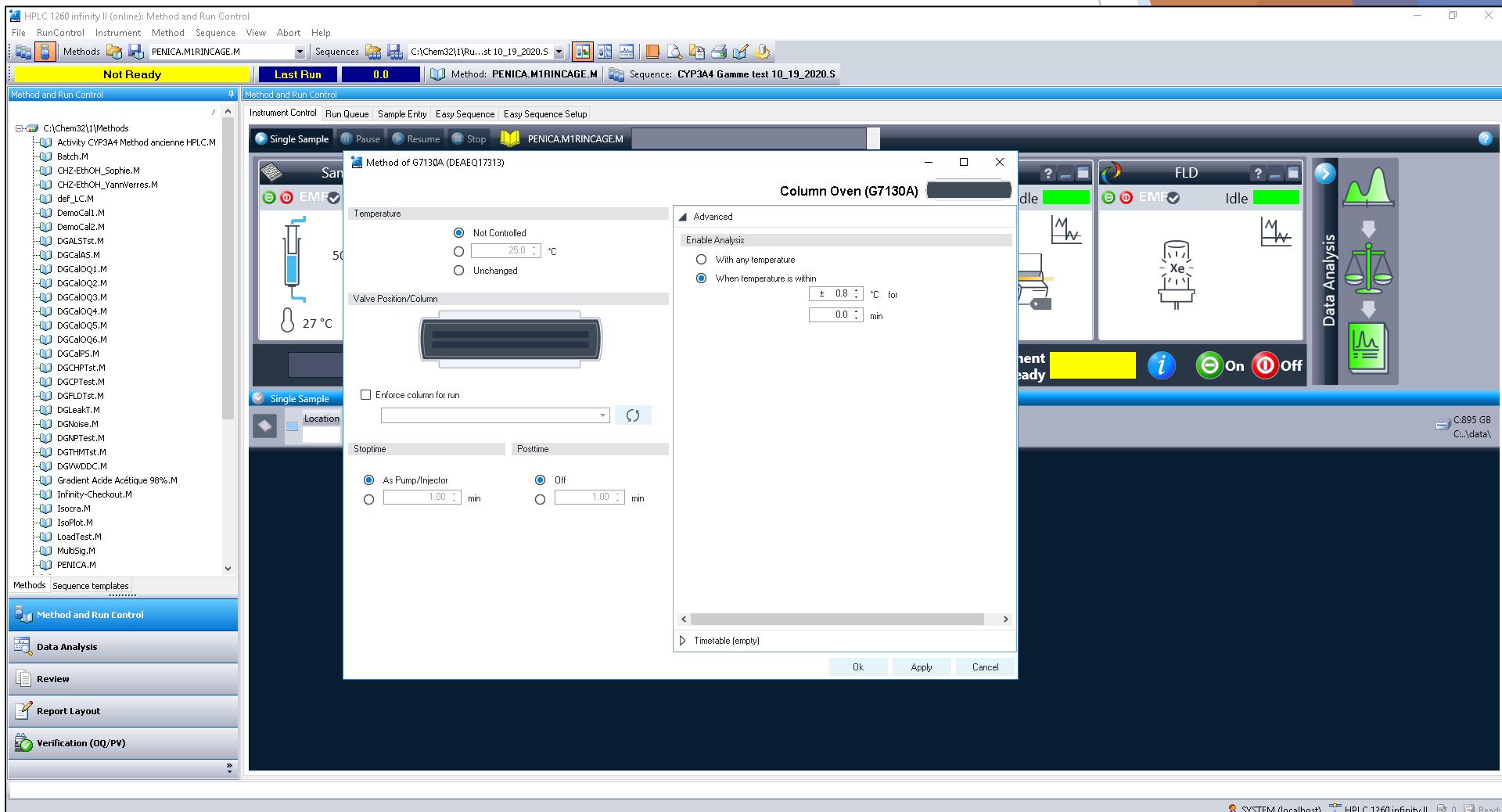


Interface « Online » du logiciel HPLC

Colonne et four

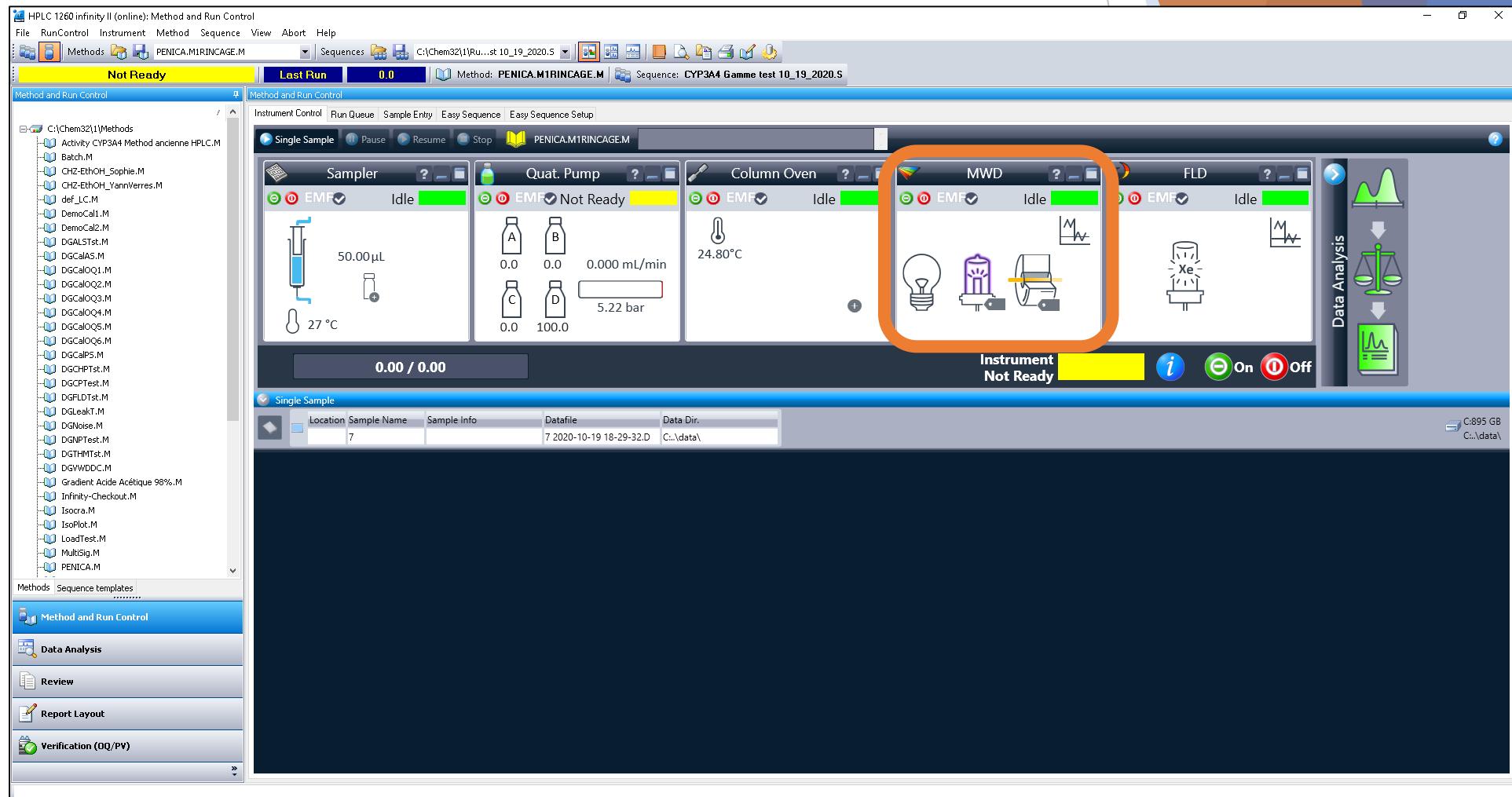
-Température du four (RT
+ 5 °C)

-Tolérance de variation



Interface « Online » du logiciel HPLC

Capteur UV-Visible



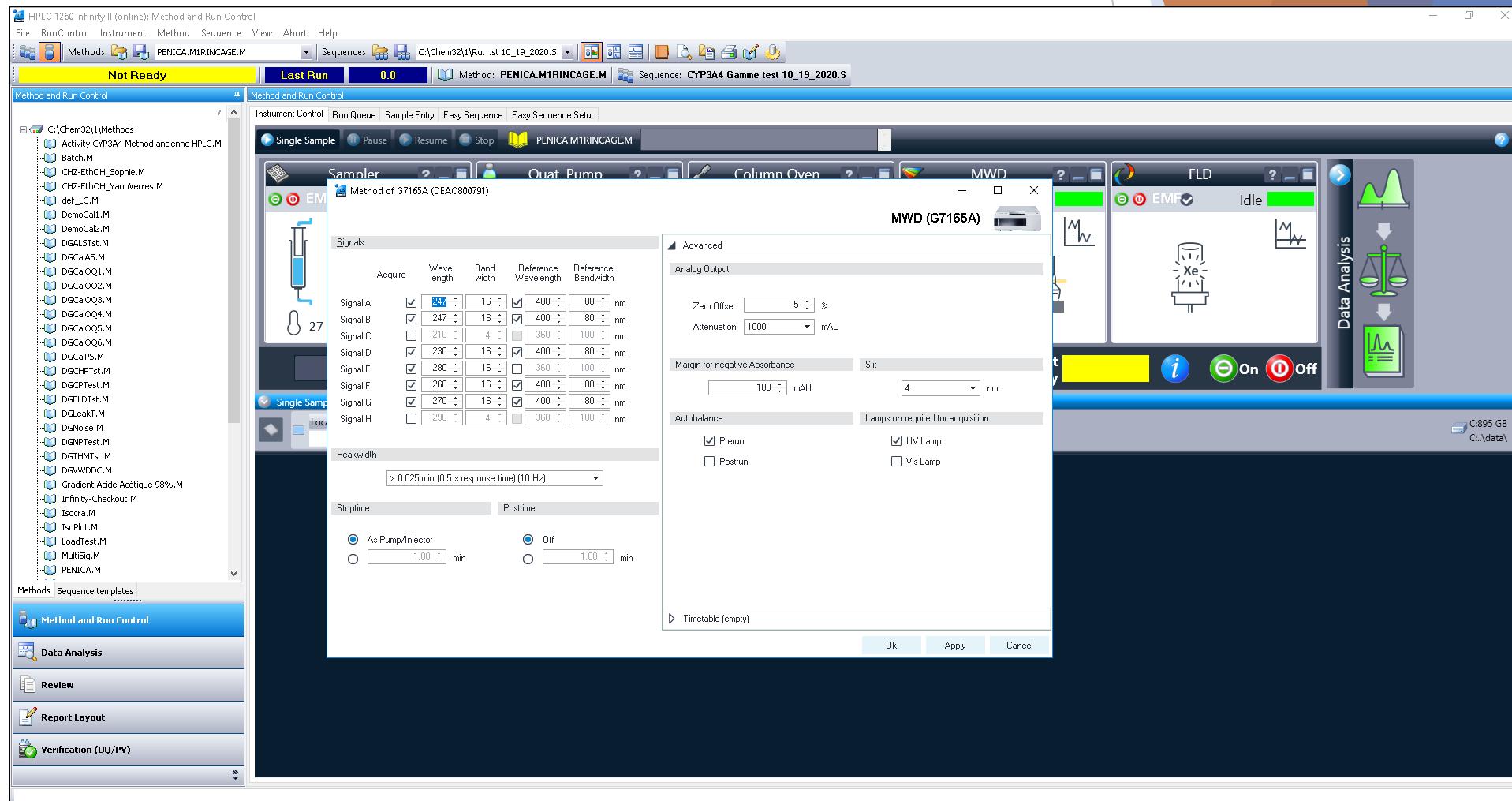
Interface « Online » du logiciel HPLC

Capteur UV-Visible

-Longueur d'onde de détection

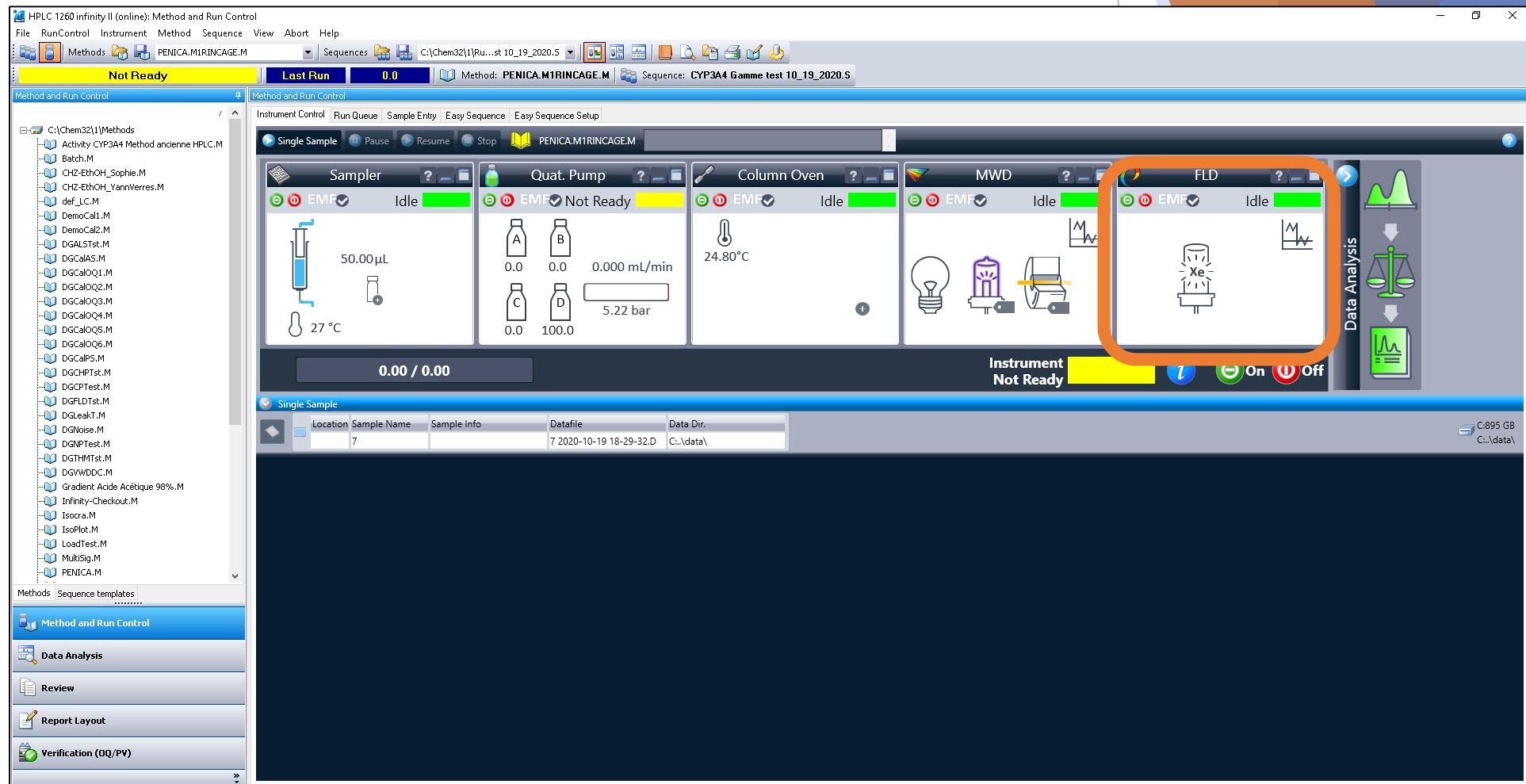
-Largeur de la lecture autour de la valeur

-Longueur d'onde de référence



Interface « Online » du logiciel HPLC

Capteur Fluorescence

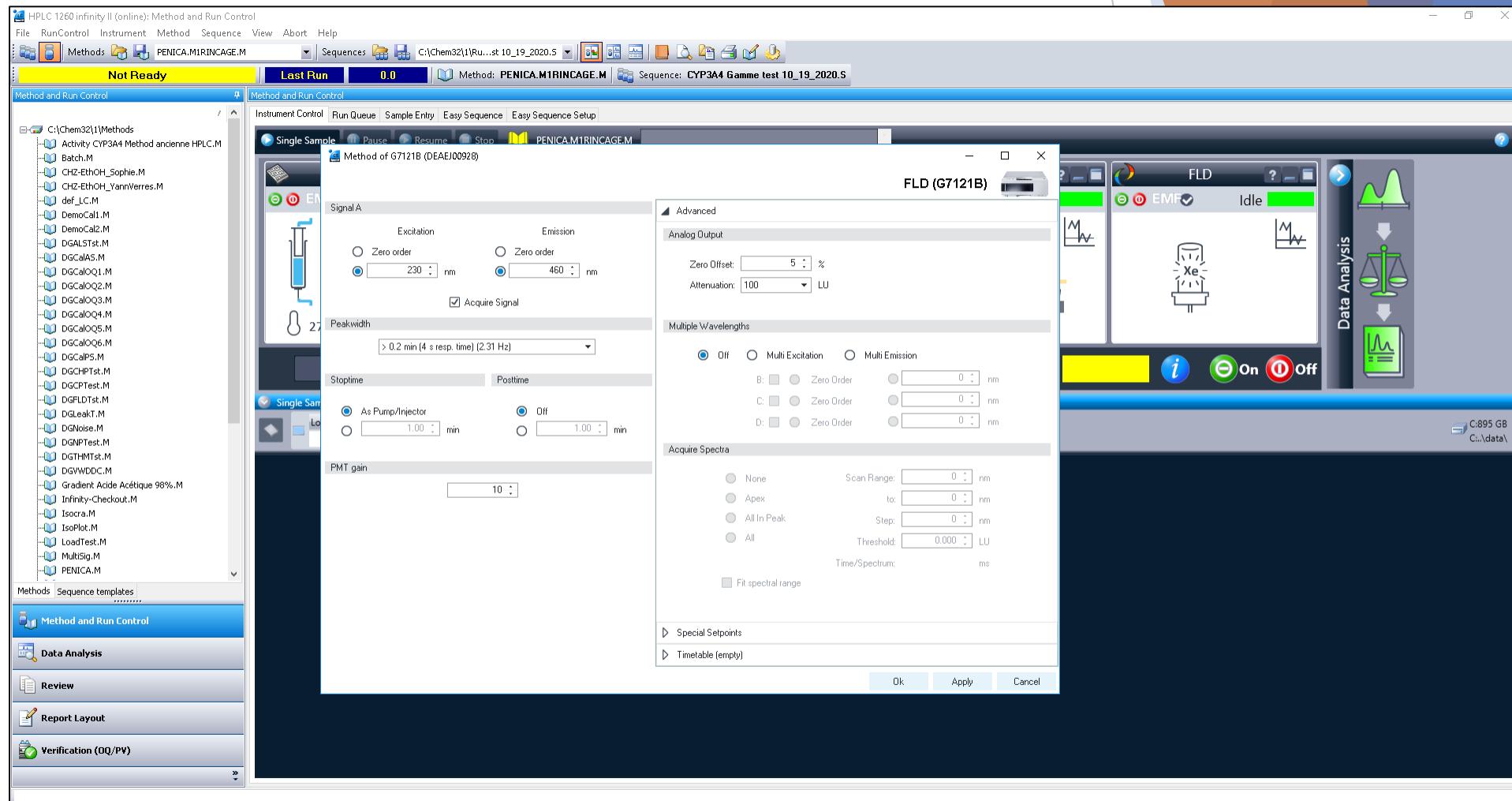


Interface « Online » du logiciel HPLC

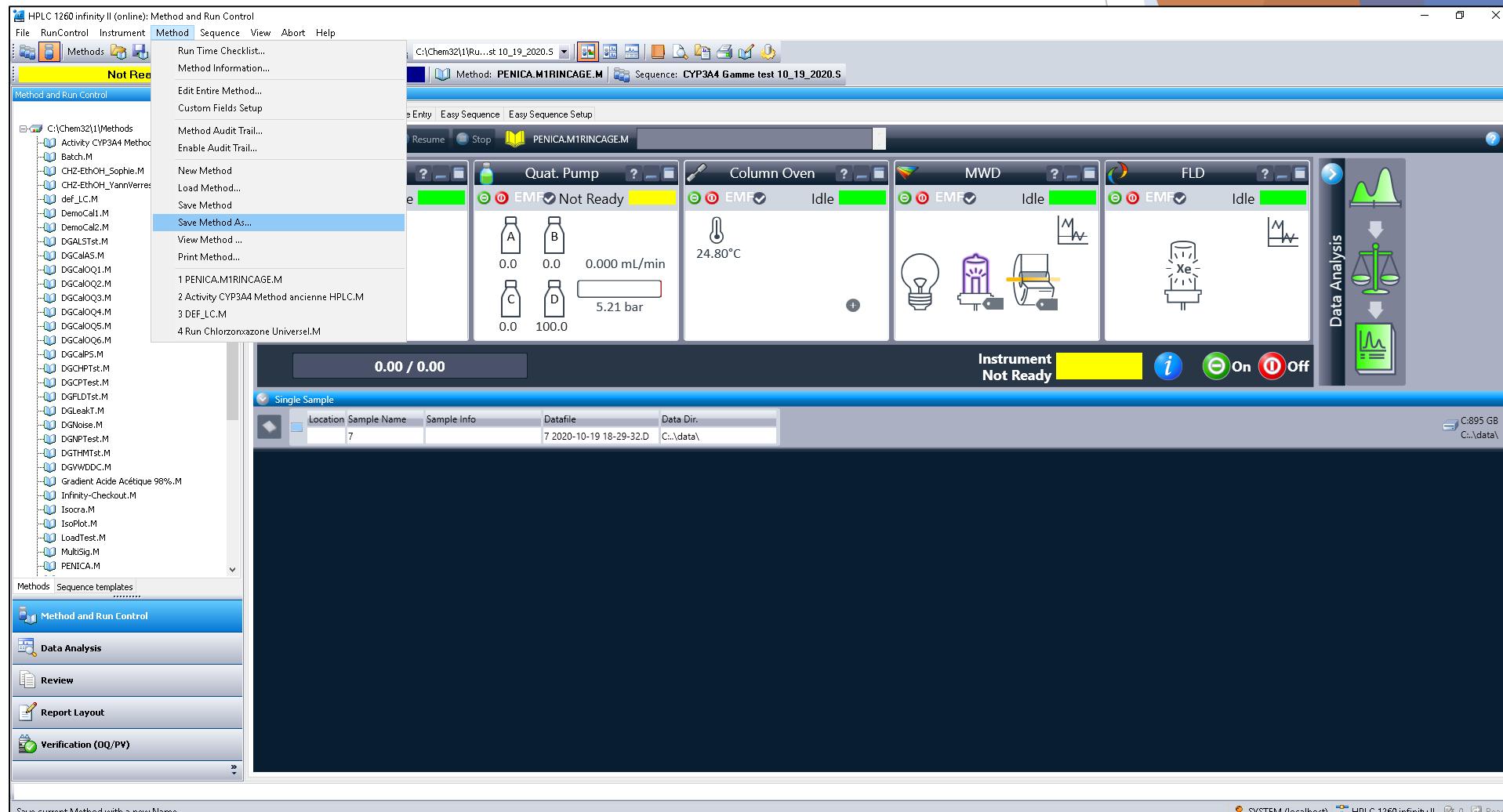
Capteur Fluorescence

-Longueur d'onde de stimulation

-Longueur d'onde de détection



Interface « Online » du logiciel HPLC



Interface « Online » du logiciel HPLC

Séquence d'échantillons

-Emplacement de l'échantillon

-Nom/Identifiant

-Protocole appliqué

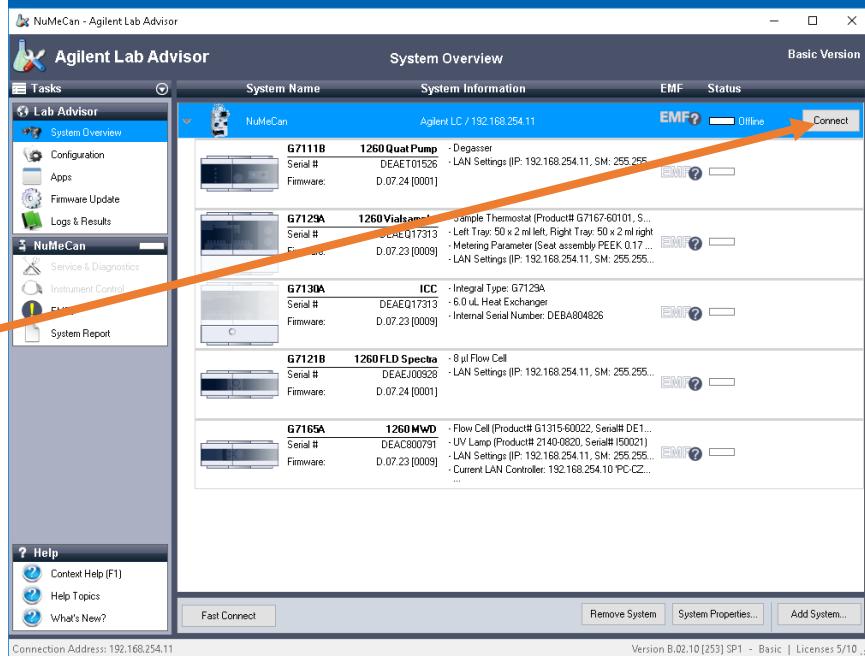
The screenshot shows the 'Method and Run Control' window of the HPLC 1260 infinity II software. The main interface is titled 'Method and Run Control' and shows a 'Sampler - Half Trays Classic - Classic' tray with 96 wells. The first 12 wells are highlighted in blue, indicating they are assigned to the sample sequence. To the right, a 'Container' panel shows a 96-well plate with a blue vertical bar indicating the position of the first sample. The bottom half of the screen displays a 'Sample List - CYP3A4 Gamme test 10_19_2020' table with 13 rows of data. The table includes columns for Sample Location, Sample Name, Method Name, Inj Volume, Sample Type, Cal Level, Update RF, Update RT, Sample Amount, Multiplier, Dilution, and ISTD1 Amount. The 'Sample Name' column lists various samples including H2O, 60H Testosterone at different concentrations (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562, 0.781, 0 μM), H-158, H-164, and a blank entry. The 'Method Name' column consistently shows 'Activity CYP3A4...'. The 'Sample Type' column shows 'Sample' for all entries. The 'Cal Level' column shows 'Average' for most samples, except for the first two which show 'Blank'. The 'Update RF' and 'Update RT' columns are also set to 'Average'. The 'Sample Amount' column shows values from 0 to 1. The 'Multiplier' and 'Dilution' columns are set to 1. The 'ISTD1 Amount' column is set to 0. The bottom right of the table shows a total of '13' samples and an 'Add to queue' button. The left sidebar of the software includes tabs for 'Method and Run Control' (which is selected), 'Data Analysis', 'Review', 'Report Layout', and 'Verification (OO/PV)'. The top menu bar includes 'File', 'RunControl', 'Instrument', 'Method', 'Sequence', 'View', 'Abort', and 'Help'. The status bar at the bottom right shows 'SYSTEM (localhost) HPLC 1260 infinity II Ready'.

#	Sample Location	Sample Name	Method Name	Inj Volume	Sample Type	Cal Level	Update RF	Update RT	Sample Amount	Multiplier	Dilution	ISTD1 Amount
1	1	H2O	Activity CYP3A4...		Sample	Average	Average		0	1	1	0
2	2	60H Testosterone 100μM	Activity CYP3A4...		Sample	Average	Average		0	1	1	0
3	3	60H Testosterone 50μM	Activity CYP3A4...		Sample	Average	Average		0	1	1	0
4	4	60H Testosterone 25μM	Activity CYP3A4...		Sample	Average	Average		0	1	1	0
5	5	60H Testosterone 12.5μM	Activity CYP3A4...		Sample	Average	Average		0	1	1	0
6	6	60H Testosterone 6.25μM	Activity CYP3A4...		Sample	Average	Average		0	1	1	0
7	7	60H Testosterone 3.125μM	Activity CYP3A4...		Sample	Average	Average		0	1	1	0
8	8	60H Testosterone 1.562μM	Activity CYP3A4...		Sample	Average	Average		0	1	1	0
9	9	60H Testosterone 0.781μM	Activity CYP3A4...		Sample	Average	Average		0	1	1	0
10	10	60H Testosterone 0 μM	Activity CYP3A4...		Sample	Average	Average		0	1	1	0
11	11	H-158	Activity CYP3A4...		Sample	Average	Average		0	1	1	0
12	12	H-164	Activity CYP3A4...		Sample	Average	Average		0	1	1	0
13	1	H2O	PENICA.M1rinage		Sample	Average	Average		0	1	1	0

Avant chaque run



Connect



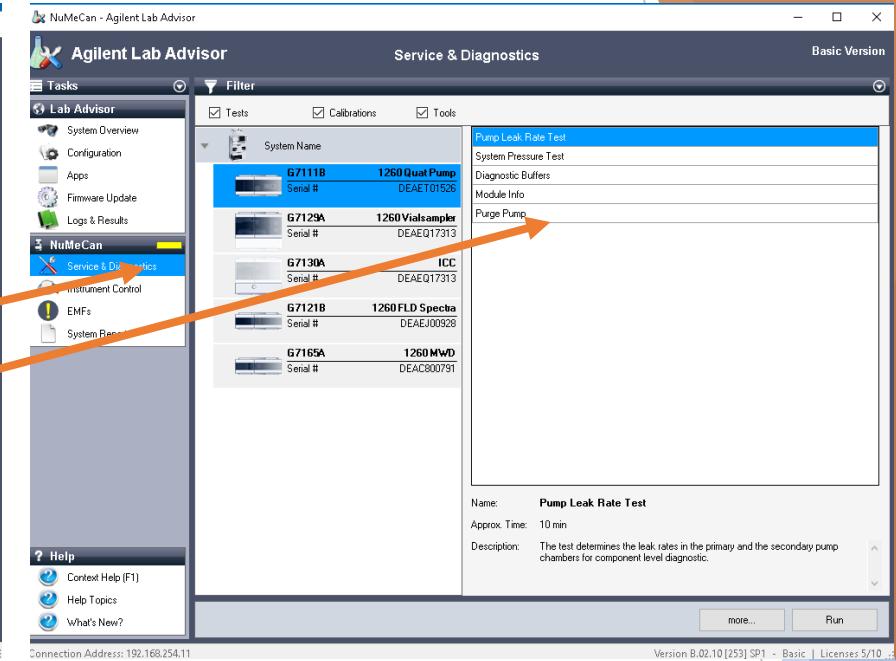
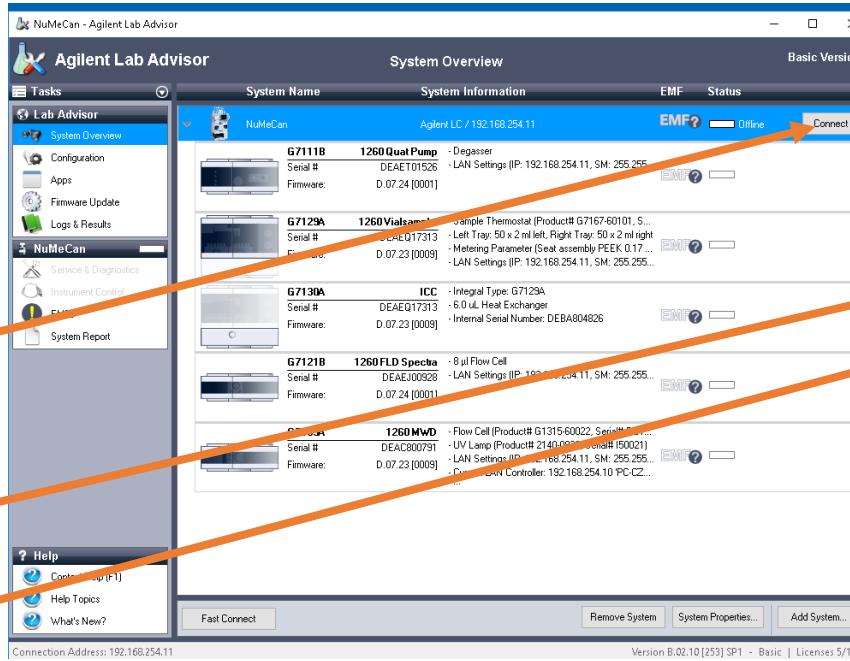
Avant chaque run



Connect

Service & Diagnostic

Purge Pump



Avant chaque run

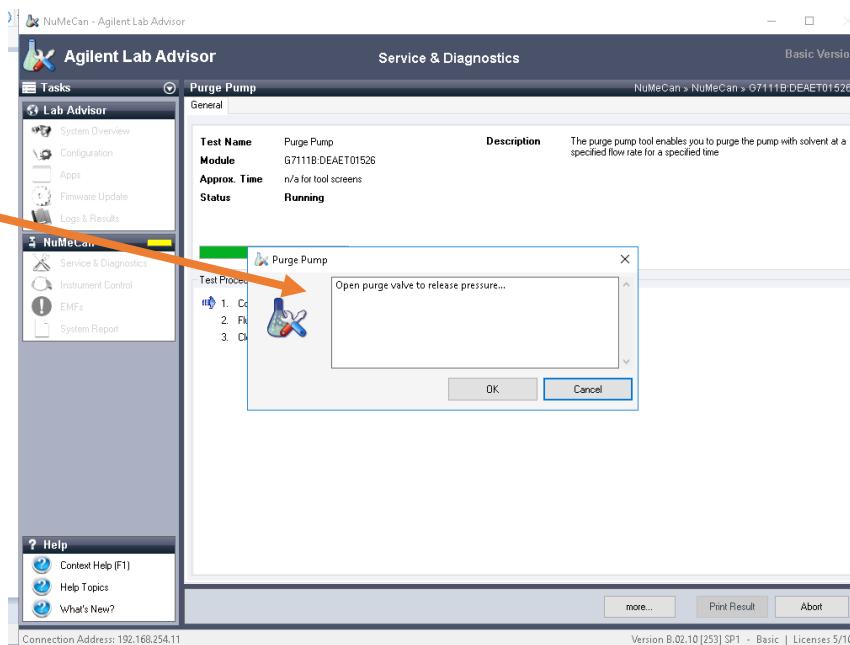
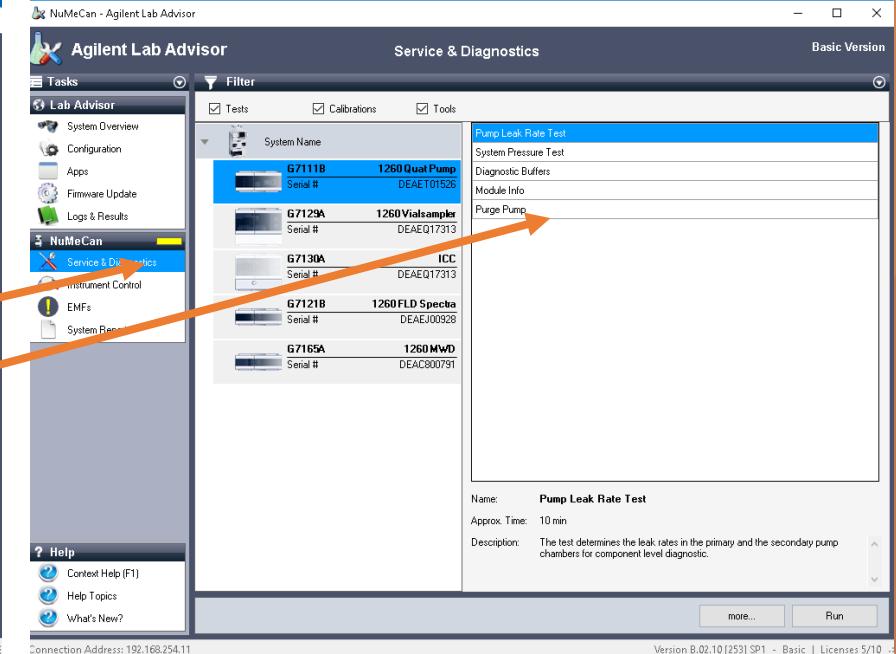
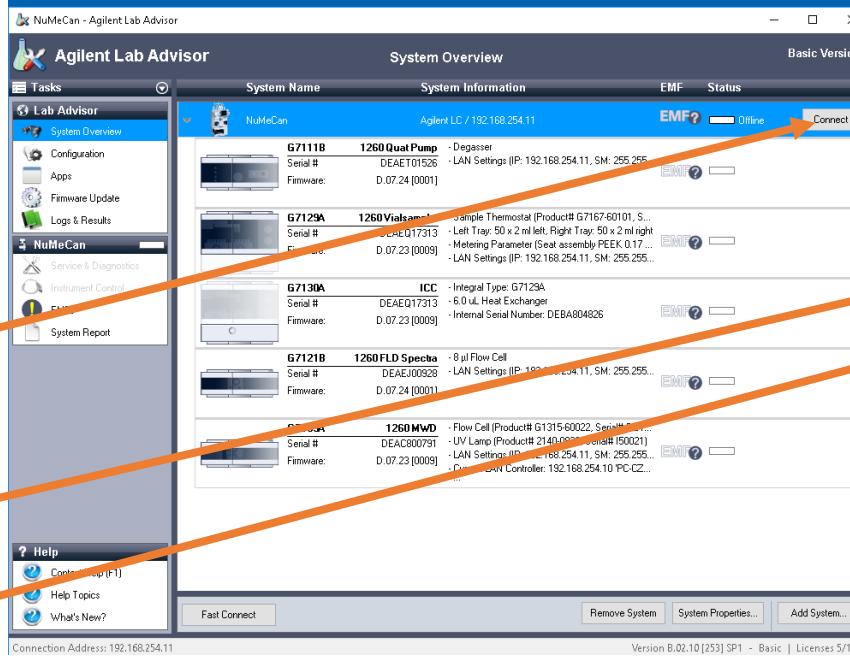


Connect

Service & Diagnostic

Purge Pump

Ouvrir la valve
quand demandé



Avant chaque run



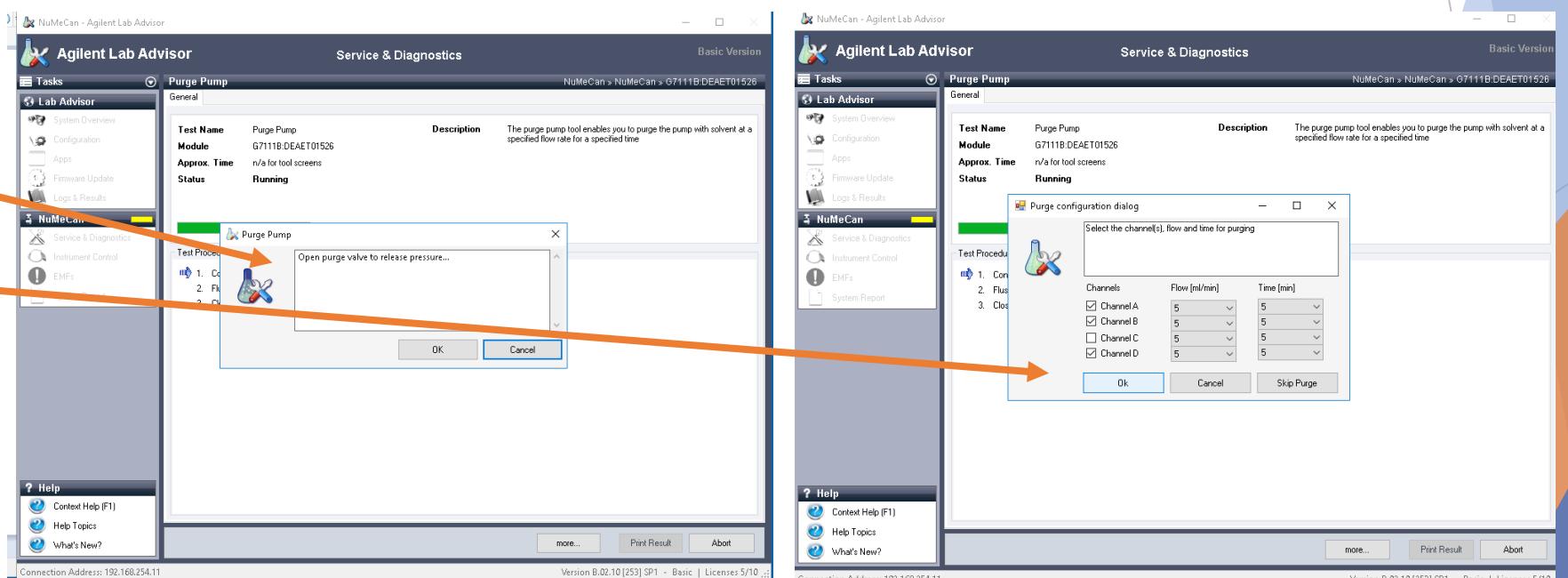
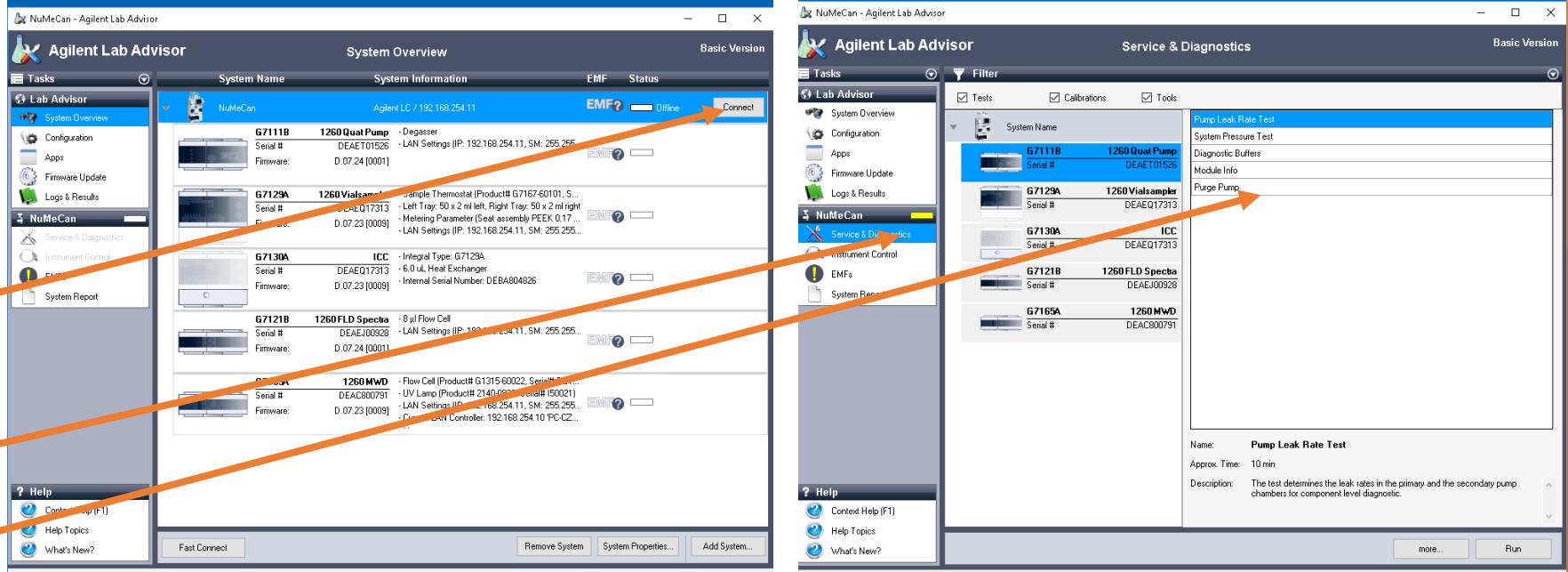
Connect

Service & Diagnostic

Purge Pump

Ouvrir la valve
quand demandé

Cocher les bouteilles à
purger.
5ml/min pdt
5 min



Avant chaque run



Connect

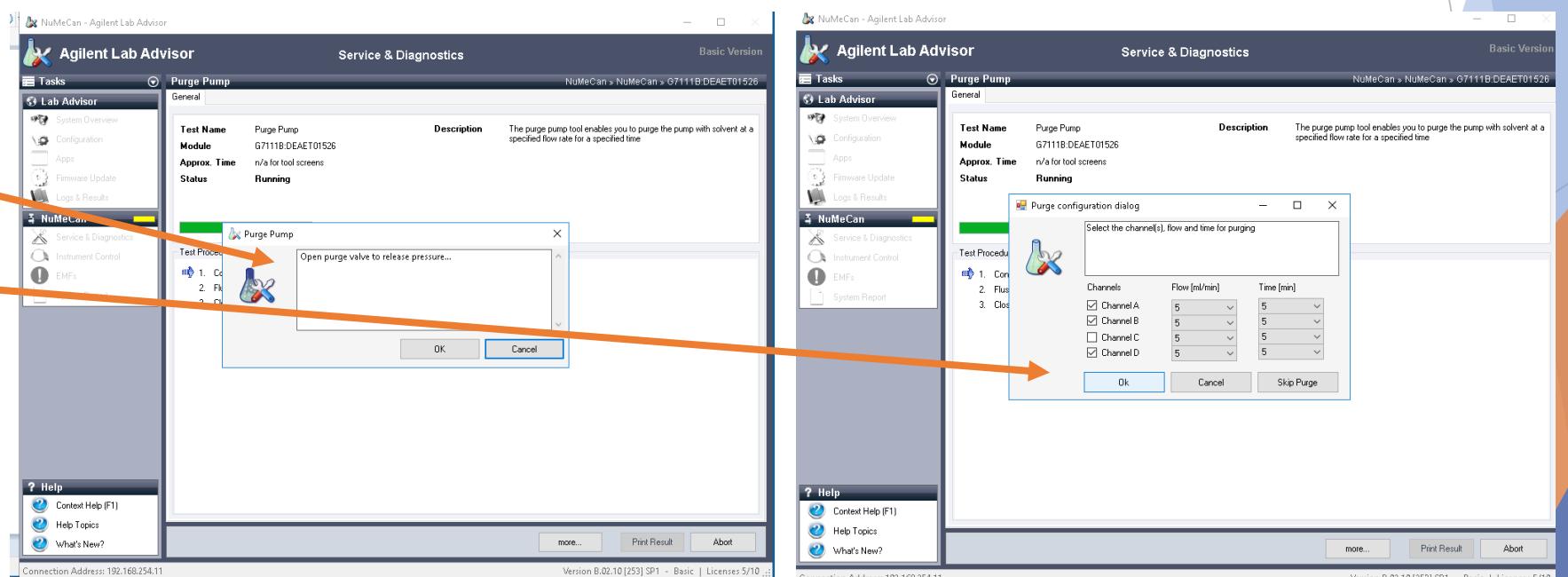
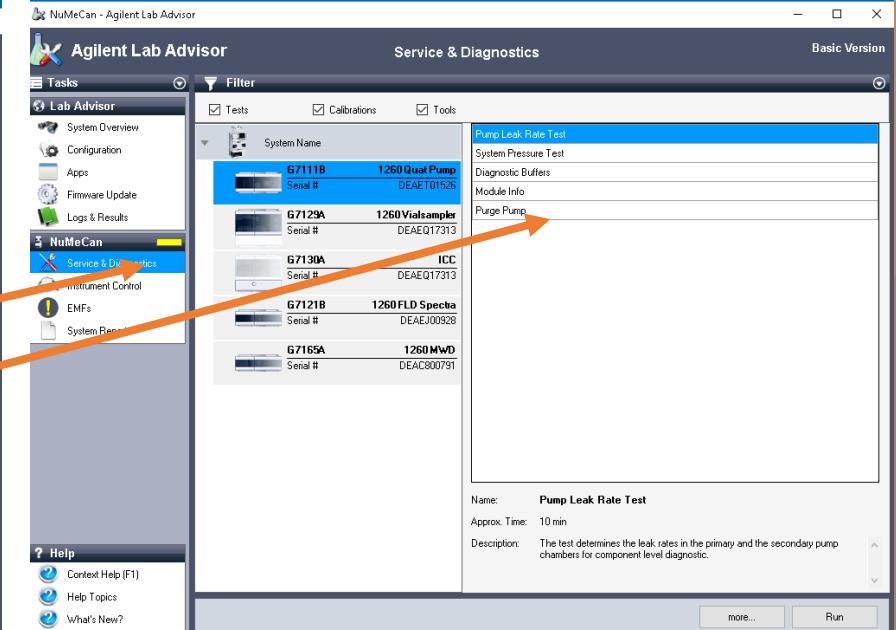
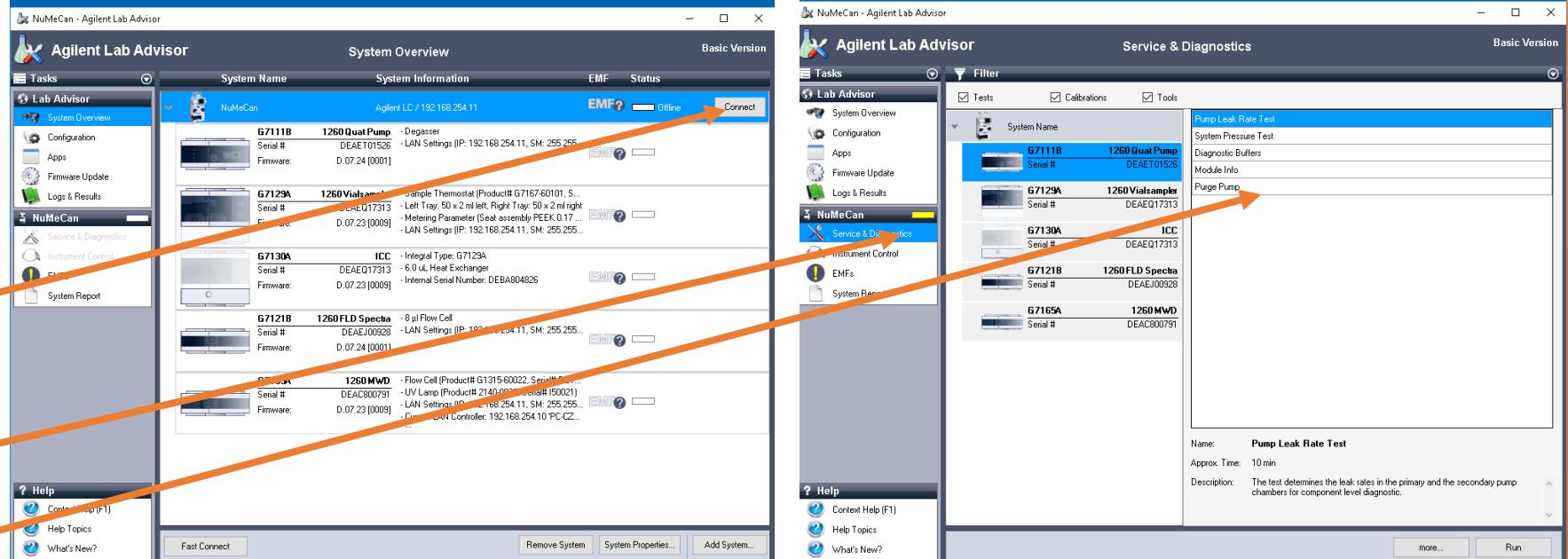
Service & Diagnostic

Purge Pump

Ouvrir la valve
quand demandé

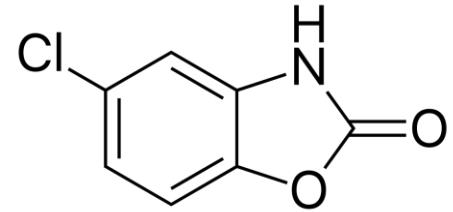
Cocher les bouteilles à
purger.
5ml/min pdt
5 min

Refermer valve
quand purge
terminée

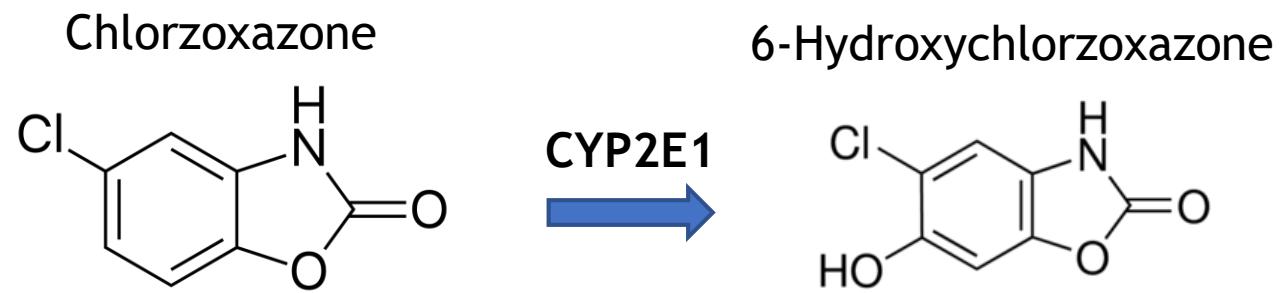


Evaluation de l'activité CYP2E1 par mesure de la métabolisation de la Chlorzoxazone

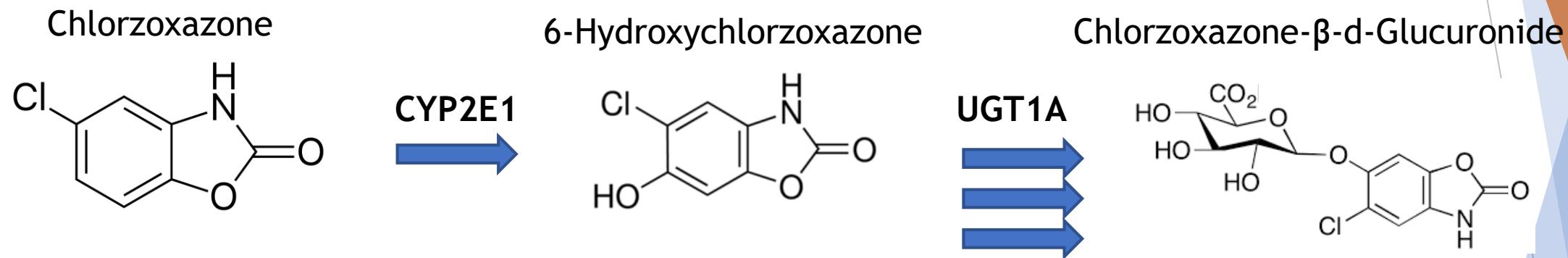
Chlorzoxazone



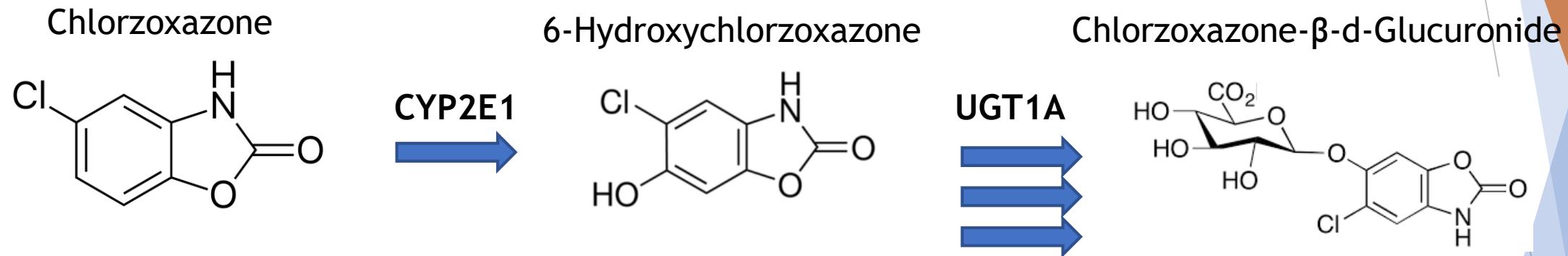
Evaluation de l'activité CYP2E1 par mesure de la métabolisation de la Chlorzoxazone



Evaluation de l'activité CYP2E1 par mesure de la métabolisation de la Chlorzoxazone



Evaluation de l'activité CYP2E1 par mesure de la métabolisation de la Chlorzoxazone



Dosage de la forme glucuronide donne l'information sur ce qui s'est formé en 6-OH, et donc une idée de l'activité du CYP2E1.

Il est aussi possible de reconvertis le O-Glc en 6-OH grâce à une enzyme, la β-Glucuronidase

Culture

-Cultiver les cellules (ex: HepaRG), faire les traitements/conditions souhaitées comme d'habitude.

Culture

- Cultiver les cellules (ex: HepaRG), faire les traitements/conditions souhaitées comme d'habitude.
- Eliminer milieu de culture, laver au PBS, et remplacer par du milieu Williams **sans rouge de phénol** et sans suppléments (pas de SVF, pas de DMSO, pas d'antibio, hydro, insuline etc ...)Le milieu contient 300µM de Chlorzoxazone

Culture

-Cultiver les cellules (ex: HepaRG), faire les traitements/conditions souhaitées comme d'habitude.

-Eliminer milieu de culture, laver au PBS, et remplacer par du milieu Williams **sans rouge de phénol** et sans suppléments (pas de SVF, pas de DMSO, pas d'antibio, hydro, insuline etc ...) Le milieu contient 300µM de Chlorzoxazone

→Le rouge de phénol peut perturber la lecture.

Et avoir moins de suppléments = moins de pics dans le profil HPLC = plus facile à analyser.

Culture

-Cultiver les cellules (ex: HepaRG), faire les traitements/conditions souhaitées comme d'habitude.

-Eliminer milieu de culture, laver au PBS, et remplacer par du milieu Williams **sans rouge de phénol** et sans suppléments (pas de SVF, pas de DMSO, pas d'antibio, hydro, insuline etc ...) Le milieu contient 300µM de Chlorzoxazone

→Le rouge de phénol peut perturber la lecture.

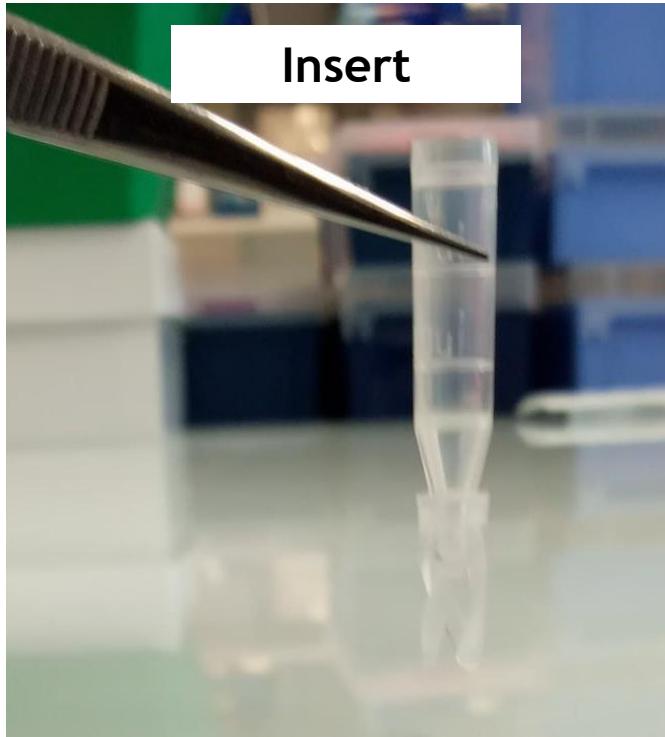
Et avoir moins de suppléments = moins de pics dans le profil HPLC = plus facile à analyser.

-Incubation 6h environ dans ce milieu.

-Récupérer les surnageants, centrifuger 10 min à +10 000 g pour éliminer les débris potentiels

-Congeler surnageants et cellules.

Echantillons

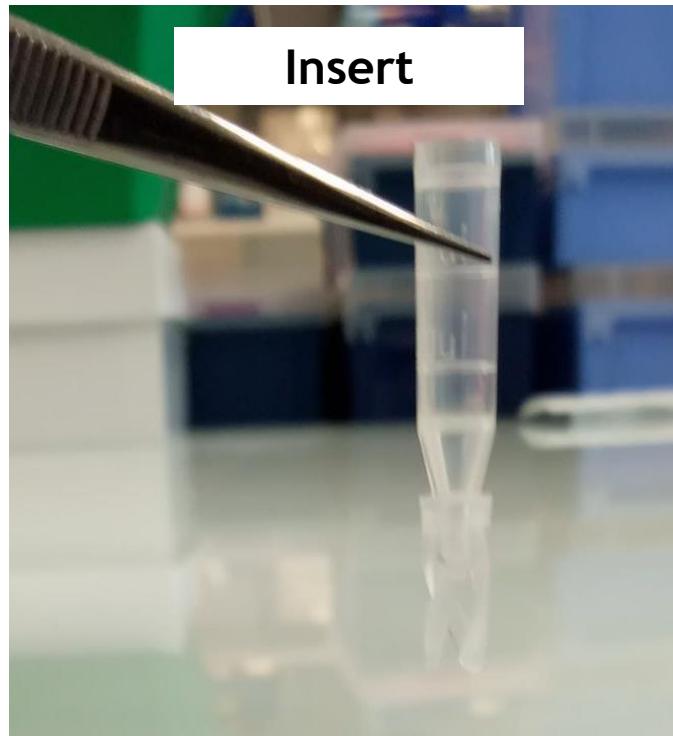


Echantillons

Eau



Premier run à blanc, vérifier propriété de la colonne.
Dernier run de lavage.



Echantillons

Eau



Premier run à blanc, vérifier propriété de la colonne.
Dernier run de lavage.

Standards:

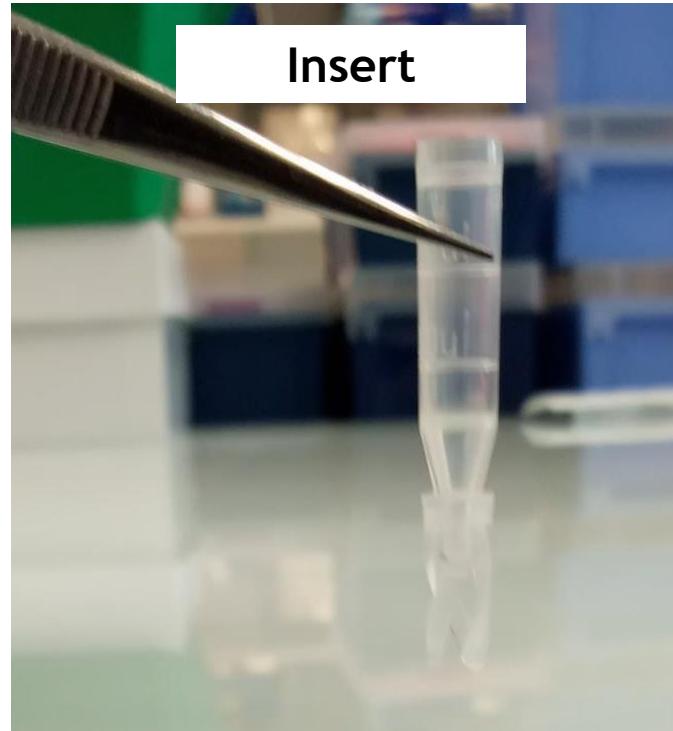


Identifier et quantifier les métabolites
(commencer à $300\mu\text{M}$)

CHZ

CHZ-6OH

CHZ-O-Glc



Echantillons

Eau



Premier run à blanc, vérifier propriété de la colonne.
Dernier run de lavage.

Standards:

CHZ

CHZ-6OH

CHZ-O-Glc

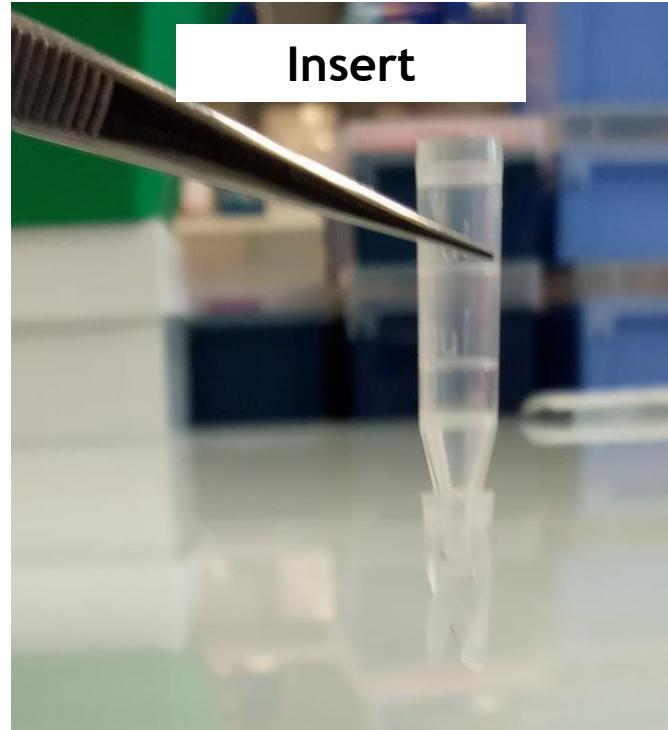
Echantillons:

X1

X2

X3

...



Solvants

- ▶ Acétonitrile
- ▶ Acide acétique (0,1%) + 0,25% Triéthylammonium (TEA)

Métabolites pas visibles sans le TEA, nécessaire de l'ajouter.

Méthode

► Injecteur

- 45 µl injecté
- Stop time à 30min
- Echantillons à RT (pas de réfrigération)

Méthode

- ▶ Injecteur

- 45 µl injecté
 - Stop time à 30min
 - Echantillons à RT (pas de réfrigération)

- ▶ Four

- Maintenu à 30°C

- ▶ Lecteur UV-Visible

- 287nm (\pm 16) Référence à 400nm (\pm 80nm)

Méthode

► Injecteur

- 45 µl injecté
- Stop time à 30min
- Echantillons à RT (pas de réfrigération)

► Four

- Maintenu à 30°C

► Lecteur UV-Visible

- 287nm (\pm 16) Référence à 400nm (\pm 80nm)

► Pompe

Temps (min)	% Acide Acétique	% Acétonitrile	Débit	Pression max
0	98	2	0,5ml/min	600bar
1	98	2	0,5ml/min	600bar
10	10	90	0,5ml/min	600bar
22	10	90	0,5ml/min	600bar
27	98	2	0,5ml/min	600bar
30	98	2	0,5ml/min	600bar

Méthode

► Injecteur

- 45 µl injecté
- Stop time à 30min
- Echantillons à RT (pas de réfrigération)

► Four

-Maintenu à 30°C

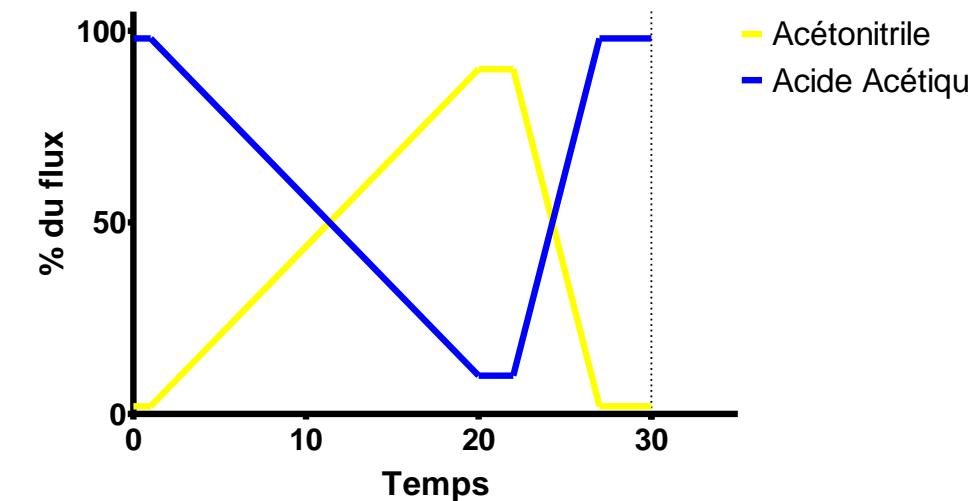
► Lecteur UV-Visible

-287nm (\pm 16) Référence à 400nm (\pm 80nm)

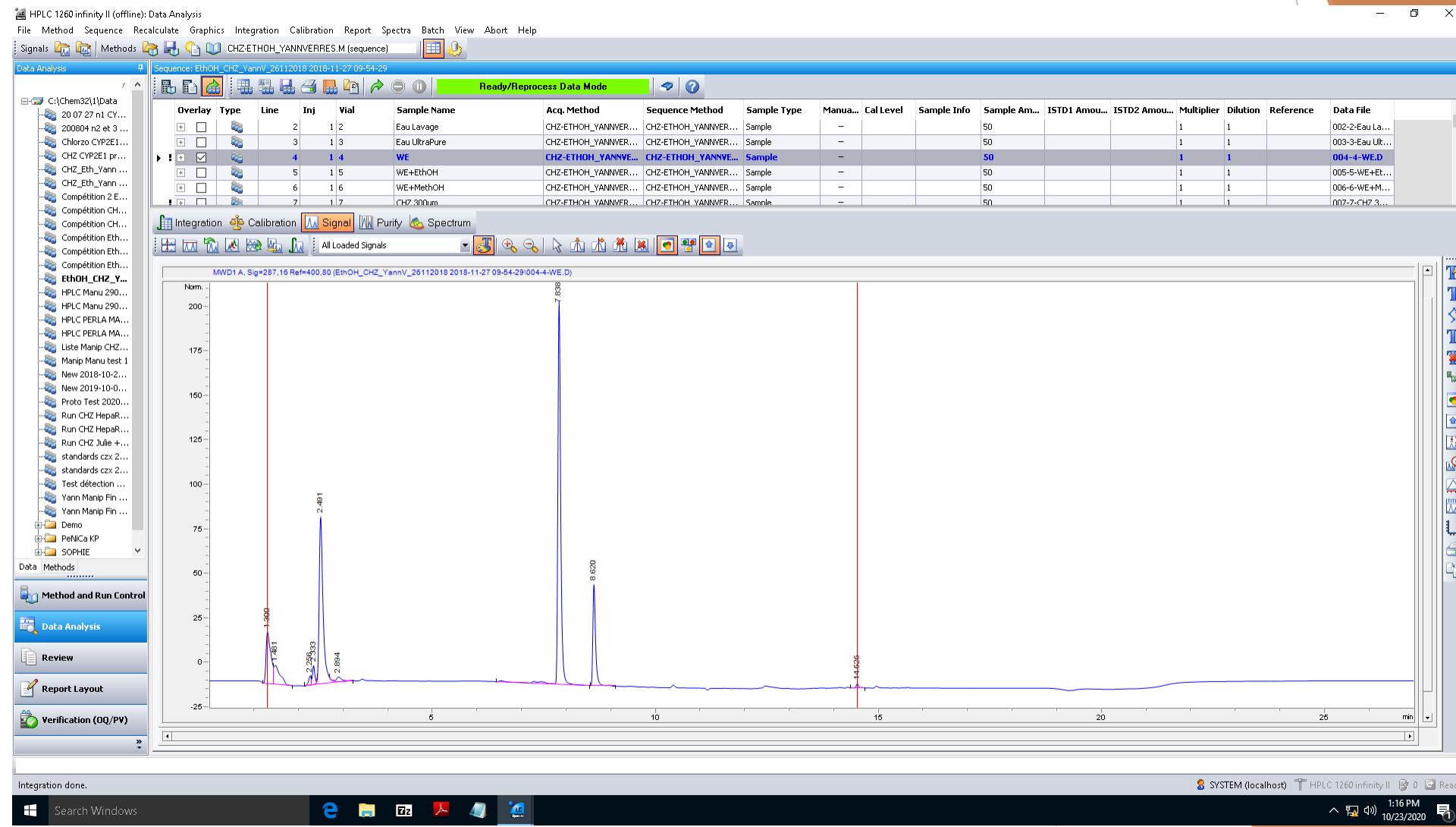
► Pompe

Temps (min)	% Acide Acétique	% Acétonitrile	Débit	Pression max
0	98	2	0,5ml/min	600bar
1	98	2	0,5ml/min	600bar
10	10	90	0,5ml/min	600bar
22	10	90	0,5ml/min	600bar
27	98	2	0,5ml/min	600bar
30	98	2	0,5ml/min	600bar

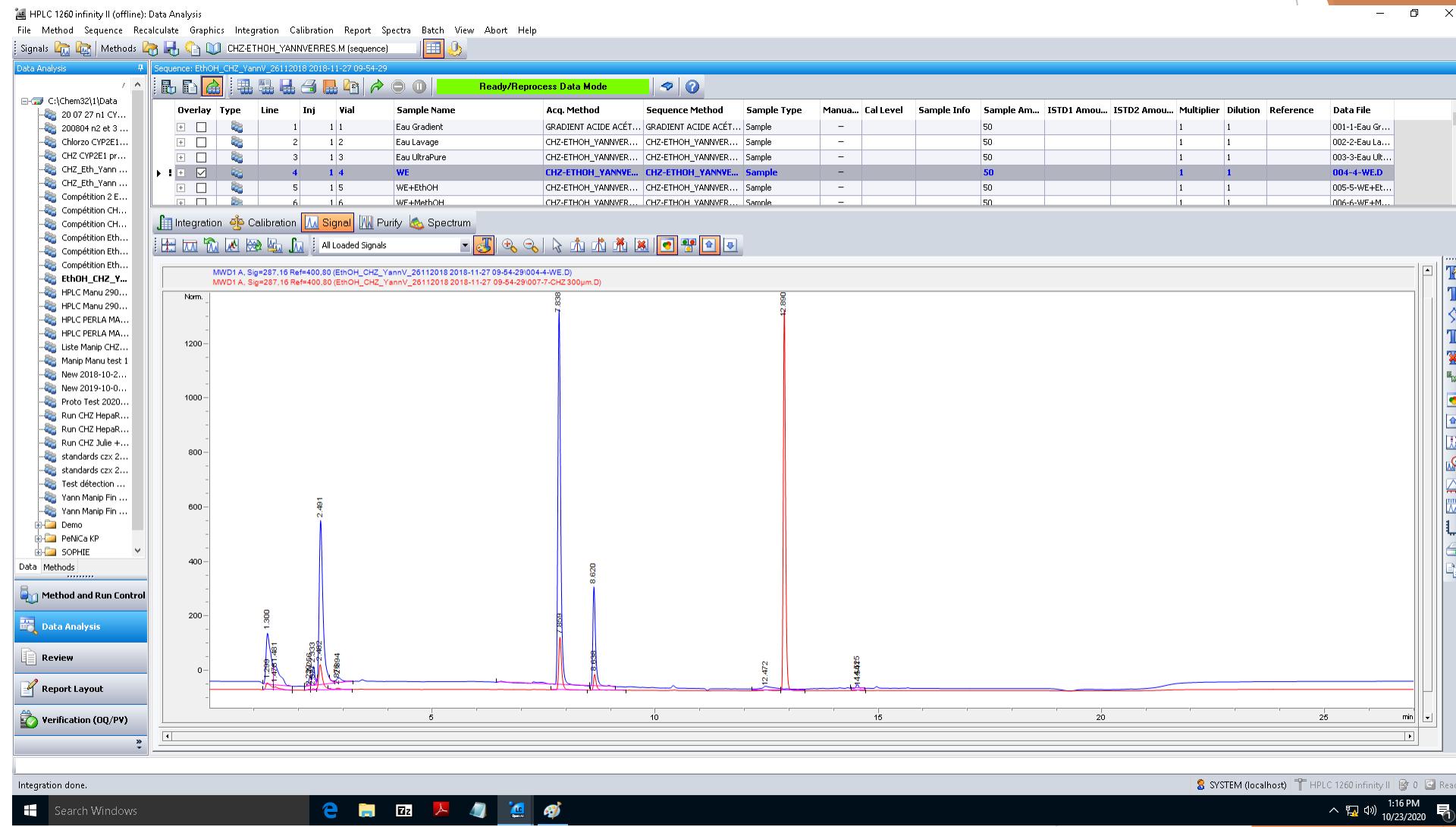
Flux des solvants lors du run HPLC



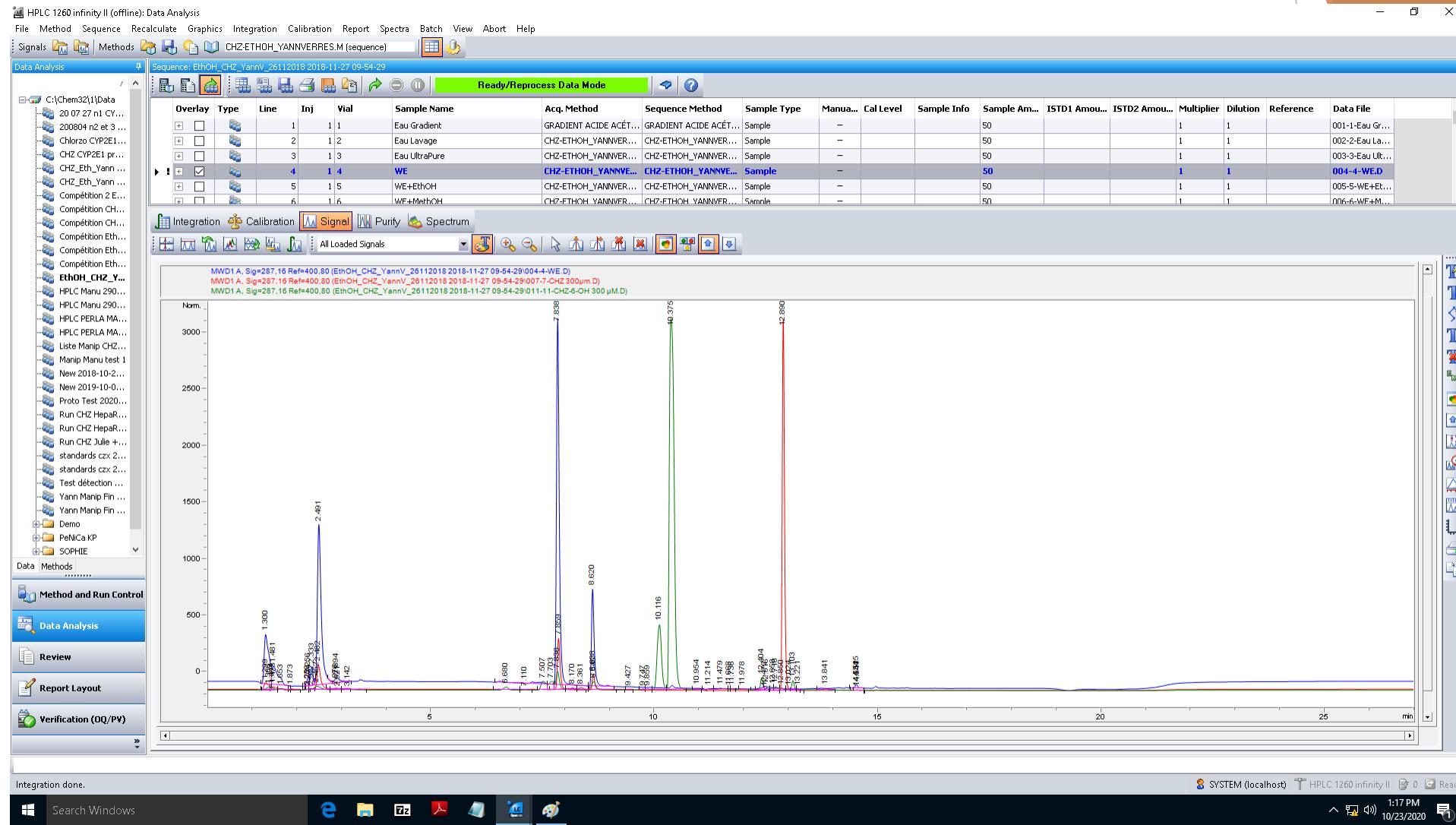
Résultats



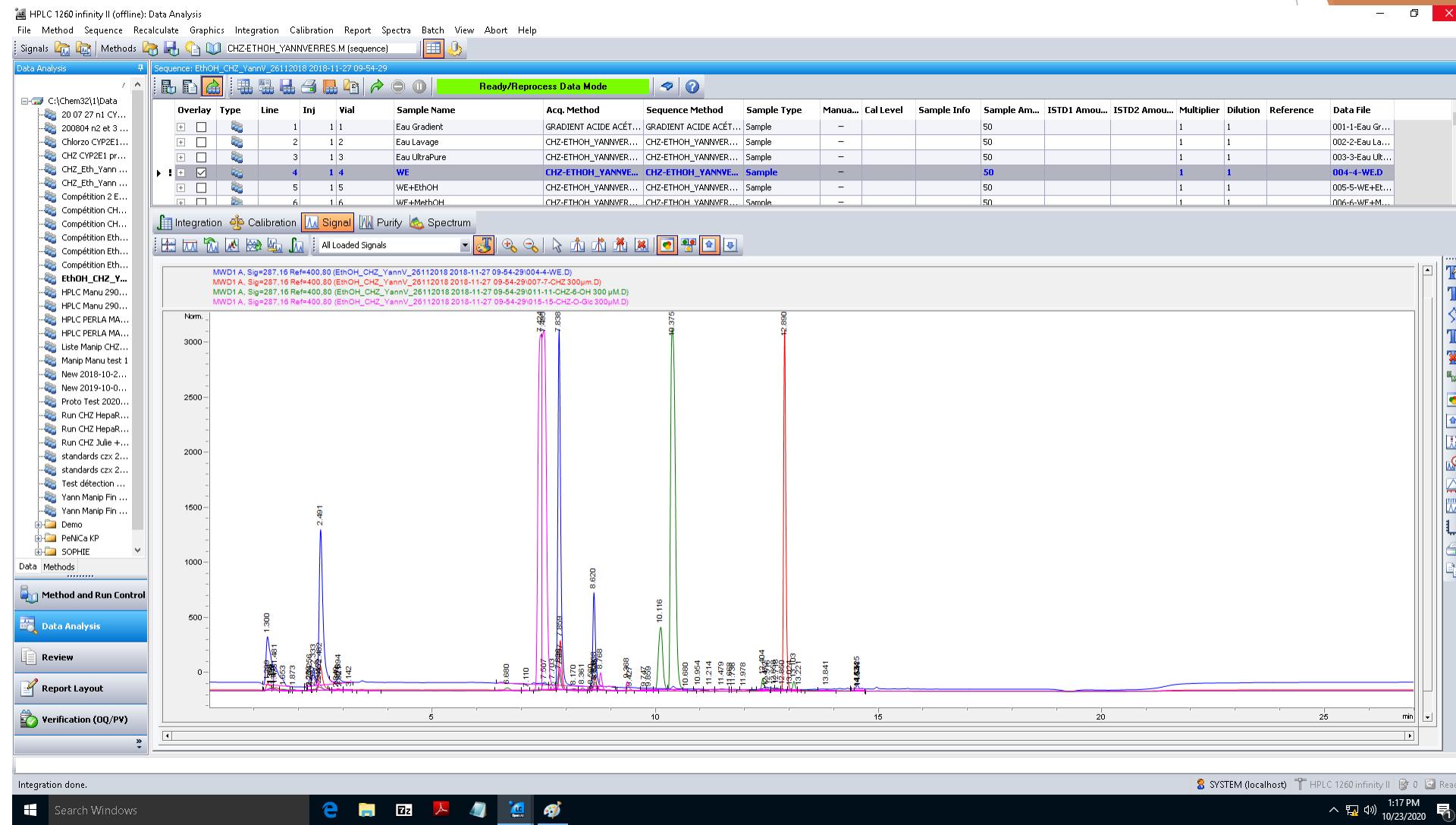
Résultats



Résultats

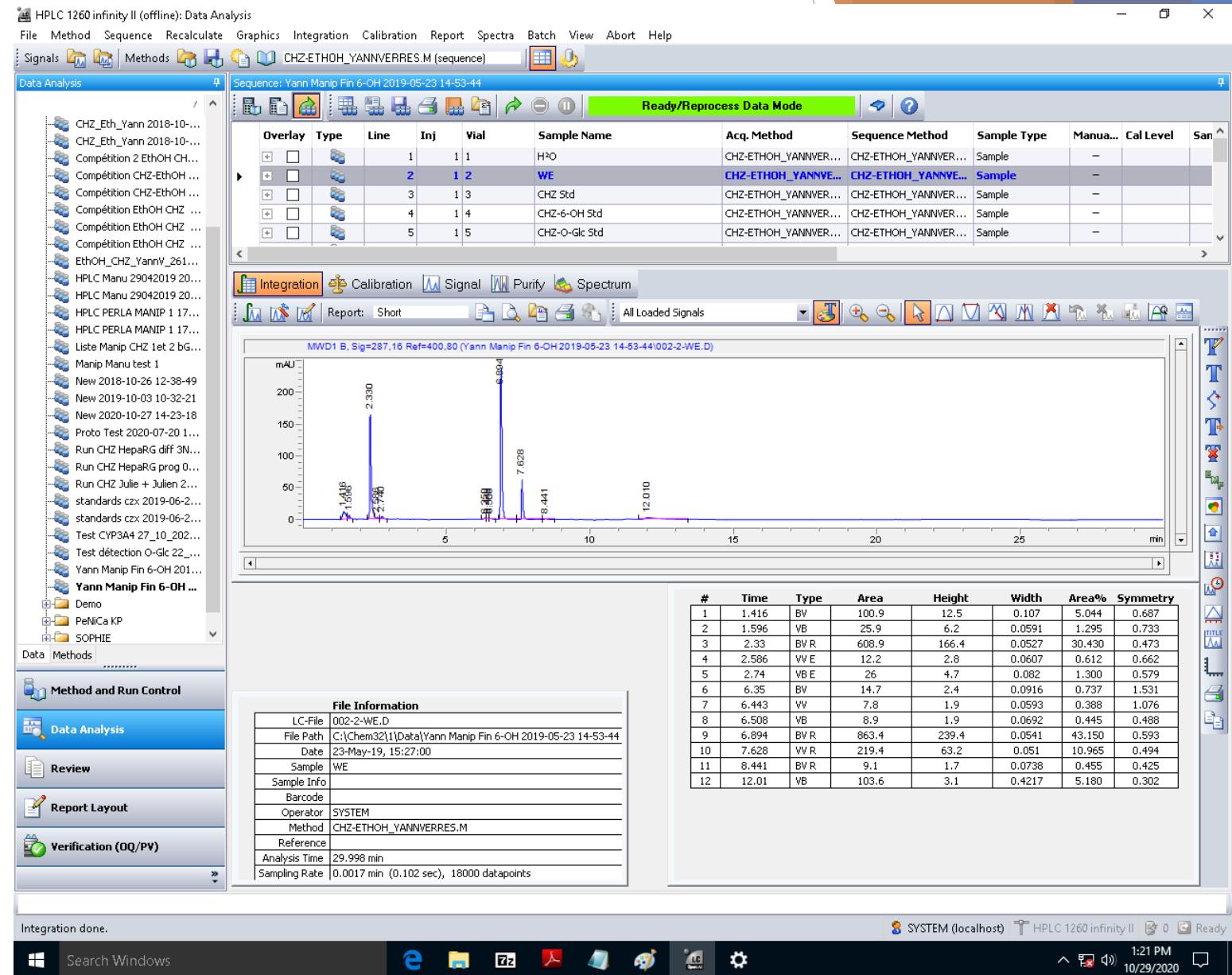


Résultats

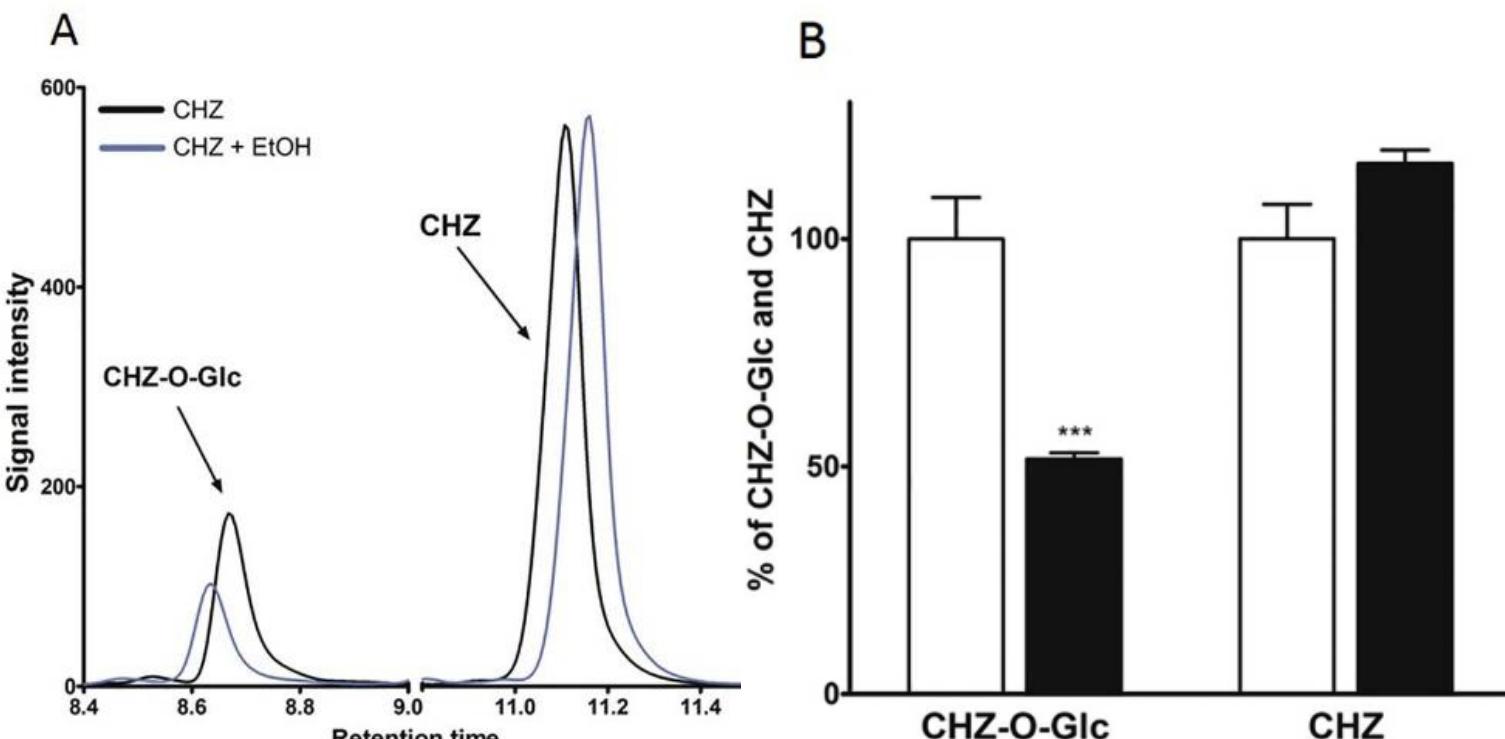


Résultats

- ▶ Profil HPLC exportable en format CSV (fichier texte) → A copier ensuite dans un tableur (Excel ou autre)
- ▶ Données d'intégration → copier le tableau et coller en document texte.
Temps du pic, valeur d'intégration, type de pic, largeur ...



Résultats



Hugbart and al. *Toxicology in vitro*, 2020

Fig. 5. UGT enzymatic activity in differentiated HepaRG cells treated by ethanol. Cells were incubated with incubation medium (William's E medium without red phenol) containing 300 μ M of chlorzoxazone (CHZ) or incubation medium (William's E medium without red phenol) supplemented with both CHZ (300 μ M) and ethanol (EtOH) at 50 mM for 4 h. The production of the CHZ-derived glucuronide (CHZ-O-Glc), reflecting UGT1A catalytic activity was analyzed by HPLC. Typical HPLC chromatograms (Fig. 5A) showing the peaks of CHZ-O-Glc and CHZ in culture media of cells incubated with CHZ and CHZ + EtOH. Peak area quantification of CHZ and CHZ-O-Glc (B) as the mean \pm SEM for three independent experiments performed in triplicate. Results are expressed as percent of control cultures (with CHZ) set at 100%. Statistics: ***p < .001 for cultures exposed to CHZ treatment compared with the cultures co-incubated with CHZ and EtOH. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Merci pour votre attention !

