



HAL
open science

Bioaccessibility and antioxidant properties of polyphenols and carotenoids from fruit and vegetables in the gastrointestinal tract

Claire Dufour, David Page, Mylène Gobert, Didier Remond, Michele Loonis, Caroline Buffière, Véronique Santé-Lhoutellier

► To cite this version:

Claire Dufour, David Page, Mylène Gobert, Didier Remond, Michele Loonis, et al.. Bioaccessibility and antioxidant properties of polyphenols and carotenoids from fruit and vegetables in the gastrointestinal tract. *Innovations Agronomiques*, 2014, 36, pp.69-82. 10.17180/aa1f-8x45 . hal-02629729

HAL Id: hal-02629729

<https://hal.inrae.fr/hal-02629729>

Submitted on 27 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Bioaccessibilité et propriétés antioxydantes des polyphénols et caroténoïdes des fruits et légumes dans le tractus digestif

Dufour C.¹, Page D.², Gobert M.³, Rémond D.^{4,5}, Loonis M.¹, Buffière C.^{4,5}, Santé-Lhoutellier V.³

¹ INRA, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon. Equipe Chimie des Antioxydants.

² Université d'Avignon, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon. Equipe Qualité & Procédés.

³ INRA, UR370 Qualité des Produits Animaux, F-63122 St Genès-Champanelle.

⁴ INRA, UMR1019, UNH CRNH Auvergne, F-63122 St Genès-Champanelle.

⁵ Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, BP 10448, F-Clermont-Ferrand.

Correspondance : claire.dufour@avignon.inra.fr, david.page@avignon.inra.fr

Résumé

Les fruits et légumes, tout comme leurs microconstituants (polyphénols, caroténoïdes) sont impliqués dans la protection contre le développement des maladies cardiovasculaires et de certains cancers. Néanmoins, l'influence de la matrice végétale sur les propriétés nutritionnelles des fruits et légumes est encore mal connue. Les projets conduits au sein de l'UMR SQPOV visent à élucider la bioaccessibilité des caroténoïdes et des polyphénols au cours de la digestion pour des fruits et légumes couramment consommés ainsi que leur capacité protectrice vis-à-vis des lipides polyinsaturés sensibles à l'oxydation. Une partie des travaux présentés dans ce manuscrit a été menée en collaboration avec les Unités UNH et QUAPA pour leurs expertises en expérimentation animale et digestion de la viande.

Polyphénols: dans une étude d'intervention, six mini-porcs ont reçu un repas de type occidental à base de viande de bœuf et d'huile de tournesol. Il a été montré que les lipides polyinsaturés de l'alimentation s'oxydaient dans le compartiment gastrique en présence des diverses formes de fer apportées par la viande. Par ailleurs, l'ajout à ce repas de fruits et légumes détaillés en dés ou de l'extrait phénolique correspondant limitait fortement l'apparition des produits d'oxydation lipidique primaires et secondaires. D'autre part, la bioaccessibilité des composés phénoliques, définie comme la fraction solubilisés dans la phase aqueuse, était généralement supérieure lorsque les composés phénoliques étaient fournis sous forme d'extrait plutôt que de fruits et légumes, en accord avec une diffusion limitée des polyphénols depuis la matrice végétale.

Caroténoïdes: les études portent sur les facteurs qui affectent le transfert des caroténoïdes depuis la matrice tomate vers la phase lipidique du bol alimentaire. Cette étape est la première limitant la bioaccessibilité de ces microconstituants lipophiles. Si nos études confirment un rôle important de leur séquestration au sein des structures natives de la matrice végétale, nous montrons également que des facteurs liés aux procédés de transformation affectent leurs propriétés de diffusion.

Mots-clés : polyphénols, caroténoïdes, digestion gastro-intestinale, bioaccessibilité, oxydation lipidique, antioxydants

Abstract: Bioaccessibility and antioxidant properties of polyphenols and carotenoids from fruit and vegetables in the gastrointestinal tract

Fruit and vegetables and their microconstituants (polyphenols, carotenoids) are inversely associated with the development of cardiovascular diseases and cancers. However, the influence of the plant matrix on the nutritional properties of fruit and vegetables remains to be elucidated. Studies led at the

joint research unit SQPOV intend to give an insight into the bioaccessibility of carotenoids and polyphenols in the course of digestion as well as their protective capacity towards dietary polyunsaturated lipids which are largely oxidizable. Part of the work presented in this manuscript has been conducted in collaboration with INRA research units UNH and Quapa owing to their expertise in animal experiments and meat digestion.

Polyphenols: in an intervention study, six minipigs received a standard Western diet containing primarily sunflower oil and ground beef meat. Lipid oxidation was evidenced in the gastric compartment when dietary polyunsaturated lipids were in the presence of various iron forms. Additionally, meal addition with diced fruit and vegetables or the corresponding phenolic extract markedly slowed down the accumulation of primary and secondary lipid oxidation products. On the other hand, the polyphenol bioaccessibility, which is defined as the soluble fraction in the aqueous phase, proved to be higher for polyphenols provided as the extract rather than diced F&V, in agreement with a limited diffusion from the plant matrix.

Carotenoids: our studies aimed at identifying factors affecting the transfer of carotenoids from the tomato matrix to the lipid phase of the gastric bolus. This step appears to be the first one limiting the bioaccessibility of these micronutrients. If our results confirmed the dominant role of their sequestration within the native structures of the plant tissues, we also showed that processing methods strongly affect their diffusivity.

Keywords: polyphenols, carotenoids, gastro-intestinal digestion, bioaccessibility, lipid oxidation, antioxidant.

1. Introduction

1.1 Les microconstituants végétaux et leurs effets bénéfiques pour la santé

Les polyphénols sont les microconstituants les plus abondants dans l'alimentation occidentale avec une consommation journalière estimée à 1,1-1,3 g/jour (Pérez-Jiménez *et al.*, 2011) ce qui les positionne devant les caroténoïdes (ca. 10 mg), la vitamine C (ca. 100 mg) et la vitamine E (ca. 10 mg). De nombreuses études épidémiologiques ont démontré qu'une alimentation riche en fruits et légumes étaient associée à un risque moindre de développement de maladies cardiovasculaires (Dauchet *et al.*, 2006 ; He *et al.*, 2006). En outre, le développement de maladies coronariennes est inversement associés à la consommation de flavonoïdes, une classe de polyphénols largement présents dans les fruits et légumes (Arts *et al.*, 2005). Pour les caroténoïdes, leur importance a été avérée pour ceux, qui comme le β -carotène, sont précurseurs de la vitamine A. Mais au-delà, de nombreuses études montrent que certains caroténoïdes, comme le lycopène de la tomate, pourraient prévenir le développement de maladies cardiovasculaires et de cancers, en particulier du cancer de la prostate (Campbell *et al.*, 2004; Sesso *et al.*, 2003 ; Singh *et al.*, 2008).

Par ailleurs, Il est maintenant clairement établi que les produits d'oxydation des lipides alimentaires sont impliqués dans le développement de maladies cardiovasculaires (Kanner, 2007; Staprans *et al.*, 2005), en induisant plus particulièrement un dysfonctionnement de la fonction endothéliale (Williams *et al.*, 1999). Ces composés oxydants et/ou électrophiles sont absorbables et, en se retrouvant dans la circulation sanguine, participent à la modification des lipoprotéines de basse densité (LDL). Il s'agit du premier évènement conduisant à la formation de la plaque d'athérome, une étape majeure de l'athérogenèse (Uchida, 2000). Enfin, une étude a montré que la décomposition d'hydroperoxydes lipidiques dans l'estomac de rat conduisait à la formation de dérivés aldéhydiques et époxydés hautement réactifs chimiquement (Kanazawa *et al.*, 1998).

Les procédés de transformation et de conservation des aliments pourraient ne pas être les seules voies conduisant à la formation de produits d'oxydation issus des lipides alimentaires. Ces derniers pourraient être formés *in vivo* et le tractus gastrique apparaît comme un site majeur de stress oxydant (Kanner *et al.*, 2001). En effet, après ingestion d'un repas de type occidental, diverses formes de fer d'origine végétale et animale vont interagir dans l'estomac avec les lipides de l'alimentation. Cette interaction est généralement impliquée dans l'amorçage de l'oxydation lipidique. Nos travaux ont montré que la métmyoglobine, la forme principale de fer provenant du muscle animal, tout comme le fer libre en présence de vitamine C, amorçaient *in vitro* l'oxydation des lipides polyinsaturés au sein d'une huile végétale émulsionnée. Un autre résultat marquant était que la dégradation des lipides pouvait être largement diminuée par la présence de composés phénoliques à des concentrations nutritionnellement acceptables (Lorrain, Dangles, *et al.*, 2010; Lorrain *et al.*, 2012).

Ainsi, les micronutriments antioxydants comme les polyphénols et les caroténoïdes pourraient exercer un rôle important pour la santé du fait de leur action dans le tractus gastro-intestinal en lien avec leur capacité antioxydante (aptitude à céder un électron ou un hydrogène et chélation des ions métalliques pour les polyphénols, piégeage de radicaux pour les caroténoïdes) — rôle dont le fonctionnement exact reste à élucider.

1.2 Bioaccessibilité et biodisponibilité des micronstituants végétaux

De par leurs structures chimiques radicalement différentes, les composés phénoliques et les caroténoïdes diffèrent dans leur mode d'absorption intestinale. Les polyphénols, qui présentent une plus grande affinité pour l'eau, transitent dans le tractus gastro-intestinal avant d'être partiellement absorbés au niveau de l'intestin grêle. Ce transport est passif pour les formes aglycones et actif pour les formes glucosylées par interaction avec des transporteurs du glucose sodium-dépendant (SGLT1) localisés dans la membrane des entérocytes (Crozier *et al.*, 2010). Les composés phénoliques plus largement glycosylés ou sous forme polymérique (tanins), sont, quant à eux, dégradés dans le colon par la flore microbienne avant absorption des métabolites. La concentration plasmatique en polyphénols, probablement sous-estimée de par la difficulté à analyser les différents métabolites, est généralement évaluée autour de 1 μM après un repas riche en fruits et légumes. Les caroténoïdes, composés liposolubles par excellence, diffusent de la matrice végétale pour intégrer les gouttelettes lipidiques lors de la phase gastrique de la digestion et les micelles mixtes issus de la rencontre entre les sels biliaires et les gouttelettes lipidiques lors de la phase intestinale de la digestion. Ils sont absorbés dans l'intestin grêle utilisant des transporteurs comme SRB1, un transporteur impliqué également dans l'absorption du cholestérol. Les caroténoïdes rejoignent la voie lymphatique pris en charge par les chylomicrons puis la voie sanguine au sein des lipoprotéines plasmatiques.

2. La bioaccessibilité des caroténoïdes est modulée par la microstructure des aliments, mais également par les procédés de transformation.

Parmi tous les facteurs affectant la biodisponibilité des caroténoïdes, la matrice végétale a été identifiée de longue date comme un des facteurs clés (West *et al.*, 1998). Les molécules lipophiles que sont les caroténoïdes sont en effet synthétisées et stockées dans des plastes, organes spécialisés au sein de la cellule végétale (ex : les chromoplastes), et leur digestion implique qu'ils soient libérés de ces structures pour pouvoir rejoindre la phase lipidique du bol stomacal et les micelles mixtes dans l'intestin grêle (Borel *et al.*, 2012). La déstructuration de l'aliment est donc identifiée comme un facteur limitant la bioaccessibilité des caroténoïdes. Lors du processus de digestion, c'est en premier lieu la mastication qui contribue à libérer les caroténoïdes en morcelant les tissus végétaux frais. En revanche, pour les fruits et légumes transformés, les procédés ont un impact fort par trois phénomènes d'importance respective variable: 1- parce qu'ils pré-conditionnent les phénomènes de diffusion qui auront lieu en

milieu gastrique, en **réduisant la taille des particules ingérées** dans l'aliment du fait d'opérations plus ou moins combinées de broyage, texturation, et/ou cuisson. En accord avec les lois de Stokes, plus les particules sont fines, plus les phénomènes de diffusion sont rapides et facilités. 2- parce qu'une partie du **transfert vers la phase lipidique se fait lors de la préparation de l'aliment**. Si celui-ci contient de la matière grasse, et si les temps de contacts entre particules végétales et matières grasses sont suffisants, alors, une partie des caroténoïdes peut être transférée à la phase lipidique préalablement à la consommation de l'aliment. Et enfin 3-, la diffusion des caroténoïdes peut être plus ou moins **facilitée du fait de remaniements de l'environnement biochimique des caroténoïdes** qui s'opèrent lors de la déstructuration du tissu végétal. En effet, contrairement à des produits issus de végétaux mais déjà déstructurés qu'on remet en forme (comme la farine par exemple) ou à des produits excrétés (comme le lait), les fruits et légumes constituent une matrice alimentaire très compartimentée et réactive. **Compartimentée**, car suivant les procédés, la matrice présente encore toute ou partie de la complexité des structures cellulaires végétales d'origine, avec tout ce que cela compte de compartiments cellulaires (cellules, vacuoles, plastes), ou de barrières (parois cellulaires, membranes), chacune possédant ses propres conditions physico-chimiques (pH, hydrophobicité). **Réactive** : car des molécules hautement réactives entre elles (de multiples couples enzymes/substrats) peuvent se côtoyer dans la cellule sans inter-réagir du fait de leur séparation dans différents compartiments cellulaires. Les opérations initiales des procédés, en détruisant plus ou moins certaines barrières, mettent brutalement en contact ces molécules, et modifient drastiquement leur réactivité ou créent des produits intermédiaires. Ces trois phénomènes conditionnent la biodisponibilité des caroténoïdes. Le modèle de cuisson hot et cold break de la tomate que nous utilisons dans l'Unité SQPOV nous a permis de confirmer les données de la littérature quant au rôle de la taille des particules et des cinétiques de diffusion vers l'huile, mais il montre également que la maîtrise de la décompartimentation cellulaire joue un rôle majeur.

Les industriels de la tomate utilisent le système de raffinage à chaud ou à froid (hot ou cold break) pour moduler la viscosité de leurs produits. Ce système est, en fait, une utilisation à des fins technologiques de la décompartimentation cellulaire : en effet, en murissant, le fruit accumule dans le cytoplasme de ses cellules, des enzymes lytiques des parois cellulaires (les plus abondantes étant les polygalacturonases (PG) et les pectinéméthyl estérases (PME), qui sont exportées de façon raisonnée et programmée à l'extérieur de la cellule afin d'assurer une lyse progressive des parois cellulaires qui vont permettre au fruit de se ramollir et devenir comestible, puis de se déliter. Lors de la transformation des fruits, et plus particulièrement, lors du broyage/tamisage initial (raffinage) des fruits, les membranes cellulaires sont rompues, assurant un contact massif des enzymes avec les pectines des parois. Si cette opération se fait à froid (Cold Breack) ou pour le moins à une température compatible avec l'activité enzymatique (jusqu'à 70°C pour les PG et PME), alors le broyat de tomate perd sa viscosité naturelle. En revanche, si le fruit est chauffé préalablement, ou immédiatement lors du broyage à des températures voisines de 90°C, alors les enzymes sont dénaturées et les parois (et leurs effets texturant naturels) sont conservées. Nos travaux ont montré que ces deux traitements n'affectent pas la concentration en lycopène de la purée de tomate, en revanche, sa bioaccessibilité est très affectée : lorsqu'on mélange la purée HB à de l'huile, son lycopène se libère et gagne l'huile plus vite et de façon plus abondante que lorsque le mélange est fait avec de la purée CB (Page *et al.*, 2012). Ce résultat apparaissait paradoxal : le système HB, censé protéger les structures cellulaires de la déstructuration enzymatique était celui qui libérait le plus de lycopène. Nous avons cherché à expliquer ce résultat en suivant deux pistes : la relation entre la taille de particule et la diffusion, et le modèle de diffusion lui-même (vitesse de transfert et phénomènes de saturation).

2.1 La saturation de l'huile et la nature des molécules participant à l'émulsion gastrique pourrait limiter la bioaccessibilité.

En utilisant un jus de tomate commercial, et en mélangeant ce jus à de l'huile de tournesol, nous avons cherché les limites physico-chimiques du transfert du lycopène vers l'huile. En effet, la manière la plus couramment utilisée pour évaluer la bioaccessibilité des caroténoïdes consiste à effectuer des digestions in-vitro en batch : dans un même erlen, les enzymes digestives sont ajoutées séquentiellement et la proportion de caroténoïdes ayant atteint les micelles mixtes générés lors de cette digestion est mesurée. Dans nos conditions, nos résultats ont montré que la saturation de la phase huile apparaît très rapidement : la concentration de saturation était aux alentours de 20 µg/ml d'huile, et était obtenue en mélangeant environ 7 volumes d'huile pour 1 volume de sauce tomate, ce qui est loin des conditions physiologiques d'un repas habituel. En revanche, dans des conditions non saturantes, seule une partie du lycopène du jus (environ 30%) était accessible (obtention d'une diffusion plateau à partir de 20 min) (Degrou *et al.*, 2013). Les conditions saturantes sont souvent atteintes dans la plupart des études de digestion in vitro, ce qui n'empêche pas de mesurer du contraste dans l'efficacité d'incorporation des caroténoïdes dans les micelles. Cette phase de transfert n'obéit donc pas uniquement à des propriétés physiques de la diffusion de caroténoïdes « libres » dans l'huile, mais serait conditionnée par d'autres éléments de la matrice.

2.2 Une différence de taille de particule n'explique pas la différence de diffusion entre purée HB et CB

Nous avons vérifié cette hypothèse par des opérations de tamisage de purées de tomate HB ou CB. Chacune a été tamisée par voie humide, sur des tamis empilés possédant des mailles de 1 mm, 250 et 125 µm. Les particules passant à travers le tamis le plus fin étant récupérées ensuite par centrifugation. Puis, chaque fraction récupérée sur chaque tamis a été pesée et séchée (bilan de masse), dosée pour sa teneur totale en lycopène (bilan de matière) et mélangée à de l'huile pour mesurer la proportion du lycopène qu'elle contient capable d'être libéré dans l'huile (lycopène potentiellement bioaccessible).

Les purées totales (non tamisée) montre des teneurs en matière sèche et en lycopène proches, mais en revanche, la purée HB libère deux fois plus de lycopène que la purée CB lorsqu'on les mélange à de l'huile (Tableau 1).

La répartition en masse entre les différentes classes de particules diverge légèrement, mais on note un classement similaire dans l'importance de chacune des fractions des deux purées. La proportion de particules de faible diamètre représente 18 à 32 % du poids sec des purées CB et HB respectivement. Néanmoins, ces fractions contiennent la majeure partie (71 et 57%) du lycopène, et à elles seules, la majorité du lycopène disponible pour la diffusion (73 et 60%). Les particules de plus grosses tailles, bien que contenant au total 30 à 40% du lycopène, n'en libère que très peu dans l'huile. Ce résultat est en accord avec la littérature récente (Lemmens *et al.*, 2011): en effet, la limite de 125 µm correspond approximativement à la taille moyenne des cellules du fruit et donc, ces fractions contiendraient majoritairement des contenus de cellules et non plus des amas de cellules plus ou moins intactes comme les fractions de tailles supérieures. Ceci faciliterait la diffusion des caroténoïdes. En revanche, la différence de diffusivité du lycopène d'une purée à l'autre ne peut pas être expliquée par une différence de taille de particules : en effet, ce sont les particules de plus petites tailles qui portent à elles-seules l'essentiel du contraste des purées, les fines particules des purées HB contenant quasiment 50% de plus de lycopène libéré que celle de CB.

Ces résultats montrent bien que le procédé de transformation (HB/CB) nous place dans la 3^e classe de facteurs limitant la diffusivité des caroténoïdes à savoir, une transformation de leur environnement biochimique, ceci ayant une influence directe sur leur propriété de diffusivité. C'est la compréhension de ce phénomène qui fait l'objet de nos recherches actuelles. Elles visent à mesurer des différences de structure et de composition des particules fines à l'aide d'outils analytiques variés (microscopie, analyse de composition lipidique par HPLC, présence de protéines éventuellement issues des structures natives

contenant les caroténoïdes dans la cellule). En parallèle, nous affinons notre connaissance des conditions physico-chimiques qui déclenchent la libération du lycopène (origine enzymatique, physique...) pour pouvoir les maîtriser indépendamment des phénomènes de perte de viscosité. A terme, le but de ces recherches vise à fournir des aliments à base de fruits et légumes présentant des disponibilités en caroténoïdes plus importantes pour mieux bénéficier du potentiel santé de ces matrices végétales.

Tableau 1 : Bilan de masse (teneur en matière sèche), de matière (lycopène total) et de lycopène potentiellement bioaccessible (lycopène libéré dans l'huile) d'un tamisa équivalent à 100 g de purée de tomate obtenue par procédés Cold Break (CB) ou Hot Break (HB). Chaque valeur représente la moyenne de 3 expériences indépendantes.

Fractions *	Matière sèche (en g)		Masse totale de lycopène (en mg)		Lycopène libéré dans l'huile (en mg)	
	CB	HB	CB	HB	CB	HB
	purée totale (non tamisée)	5.46	5.22	4.49	5.52	0.50
>1 mm	0.48	0.23	0.43	0.30	0.01	0.01
[1 mm-250 µm]	2.13	1.55	0.51	0.74	0.03	0.04
[250 µm-125 µm]	0.50	0.63	0.07	0.14	0.01	0.01
<125 µm	1.03	1.70	3.21	3.15	0.37	0.66

*pour 100 g de purée fraîche

3. Les fruits et légumes et leurs composés phénoliques protègent les lipides alimentaires de l'oxydation au cours de la digestion gastrique

Les lipides polyinsaturés dont font partie les acides gras essentiels linoléique et linolénique, sont largement présents dans notre alimentation, en particulier à travers la consommation d'huiles végétales comme celles de colza ou de tournesol. Les acides gras polyinsaturés sont des molécules très réactives vis-à-vis de l'oxygène et divers mécanismes d'oxydation coexistent, généralement catalysés par des traces d'ions de métaux de transition.

L'objectif de notre étude d'intervention était d'évaluer le niveau d'oxydation des lipides alimentaires dans le compartiment gastrique ainsi que la capacité de polyphénols végétaux, fournis comme fruits et légumes (F&L) ou comme extrait de ces derniers à inhiber l'oxydation lipidique (Gobert *et al.*, 2014). Six mini-porcs femelles (race Göttingen, âgés de 12–16 mois, poids 20–25 kg) ont été équipés d'une canule permanente sur le corps de l'estomac, au milieu de l'axe de la grande courbure. Trois repas tests ont été offerts aux différents animaux contenant principalement de l'huile de tournesol et de la viande de bœuf hachée (repas BOEUF). Les polyphénols étaient apportés sous différentes formes : des dés de pommes et quetsches crues et d'artichauts cuits pour le repas F&L et un extrait hydroacétonique issu des F&L pour le repas EXTRAIT. Les digestats (volume moyen 60 mL) étaient collectés par gravimétrie à 15, 45, 90, 150, 240, et 330 min après l'ingestion des repas. L'évolution du pH, de différents marqueurs de l'oxydation lipidique (diènes conjugués, TBARS) et du système pro-oxydant (formes de fer héminique et non-héminique) a été suivie au cours du temps.

3.1 Evolution du pH au cours de la digestion gastrique

Après ingestion d'un repas occidental (BOEUF), le pH gastrique augmente très rapidement de 2.1 en basal à 5.6 après 15 min (Figure 1). En présence de F&L ou de l'extrait, un pH de 4.5 est atteint soulignant un effet repas statistiquement significatif ($p < 0.05$). Cet effet est à mettre en relation avec la présence de sucres solubles, de polyphénols, d'acides aminés ou de peptides issus des F&L. Le pH décline alors de manière quasi-linéaire, bien que plus rapidement pour le repas BŒUF. Après 330 min, le pH n'a pas atteint le pH basal suggérant qu'une durée de 5h30 n'a pas été suffisante pour conduire à la digestion totale des 3 repas.

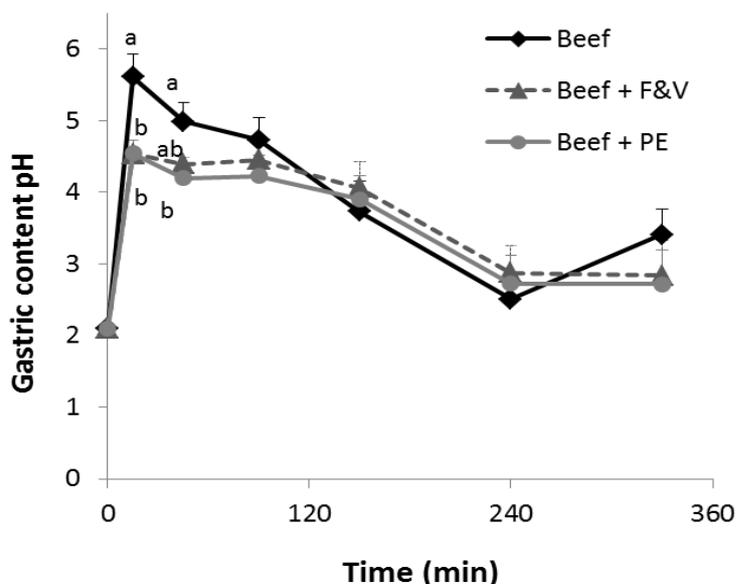


Figure 1 : Evolution du pH gastrique après l'ingestion par des mini-porcs des trois repas tests : BŒUF (Beef), F&L (F&V) et EXTRAIT (PE) (moyenne \pm SEM, $n = 6$). Des lettres différentes indiquent des différences statistiques ($p < 0.05$).

Dans la plupart des études d'intervention mesurant le pH gastrique pour des repas complexes, des repas liquides sont infusés par sondes naso-gastriques à des humains. Dans cette étude, les aliments sont solides et fournis après des transformations domestiques classiques : hachage, cuisson, découpage, mixage. Les cinétiques de pH enregistrées pour les digestats gastriques des mini-porcs sont en accord avec les celles rapportées dans la littérature pour la consommation par des humains d'un repas occidental liquide additionné de purée de légumes (pH max 5.4) (Tyssandier *et al.*, 2003) ou un substitut liquide de repas comme Ensure Plus^R (pH max 6.6) (Kalantzi *et al.*, 2006). Un pH élevé est observé seulement quelques minutes après l'ingestion du repas, en lien principalement avec le pH intrinsèque de l'aliment et sa capacité tampon. Dans la viande, les protéines et la carnosine jouent ce rôle. L'élévation rapide du pH est en général suivie par un déclin quasi-linéaire pouvant prendre 3 à 5 h selon le repas avant un retour au pH basal.

Les données cinétiques de pH acquises dans cette étude, tout comme les données acquises par d'autres équipes sur la digestibilité de la viande ou de protéines laitières, montrent bien que le mini-porc présente une physiologie digestive très proche de celle de l'homme et demeure ainsi le meilleur animal modèle pour des études de digestion (Barbé *et al.*, 2013 ; Bax *et al.*, 2012).

3.2 L'évolution des formes de fer apportées par la viande au cours de la digestion

La teneur en fer total de la viande de boeuf (23 $\mu\text{g/g}$ MF) servie aux mini-porcs est dans la gamme des teneurs usuellement mesurées dans le boeuf cru (19.5-26 $\mu\text{g/g}$) ou cuit (24 $\mu\text{g/g}$). La forme hémique (19.8 $\mu\text{g/g}$ MF) contribue plus largement au pool de fer que la forme dite libre ou non-hémique (3.2 $\mu\text{g/g}$ MF) en accord avec les données pour le boeuf cru ou légèrement cuit (Min *et al.*, 2008). La

cuisson vapeur de la viande n'a donc pas induit de dénaturation du fer héminique. Par ailleurs, la forme libre est dominé par la présence de la forme Fe(III) (2.5 µg/g MF) plutôt que par la forme Fe(II) réduite et instable (0.7 µg/g MF).

Dans les repas initiaux BOEUF, F&L et EXTRAIT, les teneurs en fer total sont respectivement de 10, 8 and 9 µg/g MF en accord avec la dilution par les différents constituants des repas. Une faible dilution par les sucs gastriques (12-15%) est observée après 15 min puisque les teneurs en fer total sont de 8.5, 6.8, and 7.9 µg/g MF pour les repas BOEUF, F&L et EXTRAIT, respectivement. Lors de la digestion du repas BŒUF, le fer héminique décline rapidement pour devenir indétectable après 240 min (Figure 2).

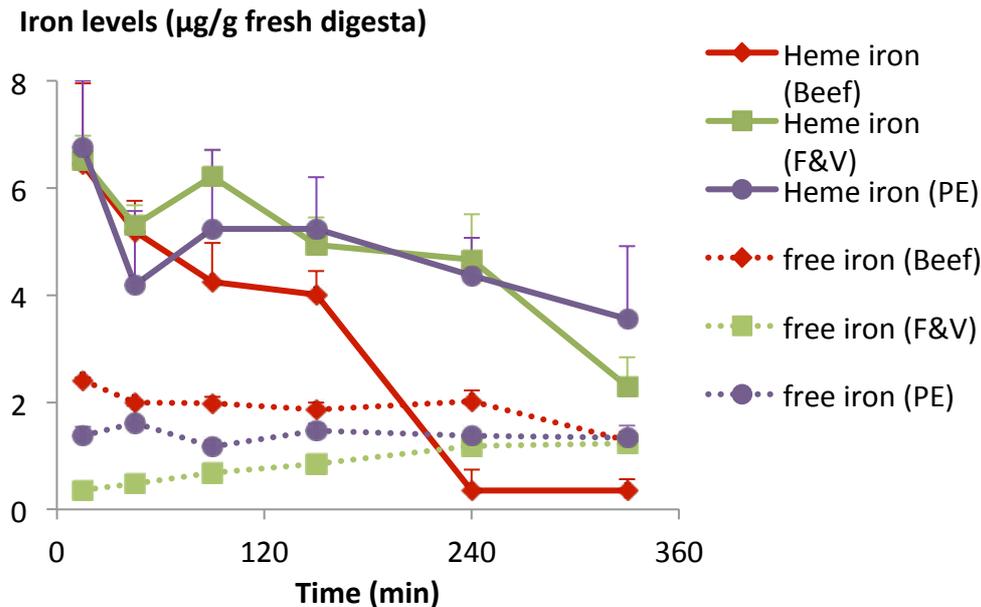


Figure 2 : Evolution des concentrations gastriques en fer héminique et fer libre après l'ingestion des repas BŒUF (beef), F&L (F&V) et EXTRAIT (PE) (moyenne ± SEM, n = 6).

Il faut noter que la metmyoglobine est dénaturée à pH < 4 par dissociation de sa partie protéique, la globine, de l'hématine. De plus, la digestion des protéines par la pepsine entraîne l'hydrolyse de la globine comme cela a été observé par spectrométrie de masse. La metmyoglobine et l'hématine sont dosés conjointement dans cette étude et le devenir de l'une ou l'autre des espèces n'est pas connu. Quant au fer libre, il est principalement représenté par la forme Fe(III) à la fois dans le repas et dans les digestats suggérant un environnement plus oxydant par rapport à la viande. La teneur en forme Fe(III) décline plus lentement que celle de la forme héminique potentiellement en lien avec le relargage d'atomes de fer du cycle protoporphyrine de la metmyoglobine. Pour les repas F&L et EXTRAIT, les teneurs en fer héminique demeurent significativement plus élevées par rapport à celle du repas BOEUF. La forme Fe(III) semble même s'accumuler en accord avec la conversion proposée du fer héminique en fer libre. La matrice végétale et les polyphénols exercent un effet sur le type et les teneurs en forme de fer, soit par ralentissement de la digestion des protéines, soit en jouant un rôle sur la stabilité des formes de fer héminique qui relargueraient plus difficilement leur atome de fer central.

3.3 Oxydation des lipides au cours de la digestion gastrique

Les diènes conjugués (DC) représentent des marqueurs précoces de l'oxydation lipidique. Ce sont des molécules ayant en commun un motif diényle conjugué associé à diverses fonctions oxygénées. Les hydroperoxydes lipidiques, premiers produits formés dans le processus complexe de l'oxydation

lipidique, sont instables et rapidement convertis en dérivés alcools, époxydes and cétones à travers des réarrangements radicalaires et non-radicalaires (Suomela *et al.*, 2005). En présence de metmyoglobine, les hydroperoxydes de l'acide linoléique sont convertis *in vitro* en cétones correspondantes (Lorrain, Dufour, *et al.*, 2010). Les clivages de liaisons carbone-carbone produisent des produits dits de coupure ou secondaire comme des aldéhydes et des alcools saturés et insaturés. Un marqueur typique de l'oxydation secondaire est le malondialdéhyde, classiquement mesuré en tant que dérivé de l'acide thiobarbiturique et dénommé TBARS (thiobarbituric reactive substance). Il faut noter que les diènes conjugués sont des marqueurs typiques des acides gras ω -6 comme l'acide linoléique présent dans l'huile de tournesol, tandis que le malondialdéhyde est un marqueur de l'oxydation des acides gras ω -3 comme les acides linoléique et arachidonique plus particulièrement présents dans la viande. Néanmoins, l'acide linoléique, en large excès par rapport aux autres acides gras à longues chaînes dans cette étude, est susceptible de former quantitativement plus de malondialdéhyde que ces derniers (Esterbauer *et al.*, 1994).

Ces deux marqueurs de l'oxydation des lipides, DC et TBARS, ont été suivis au cours de la digestion des trois repas tests et sont exprimés en teneur par rapport aux lipides indiquant ainsi un état oxydatif des lipides. Pour le repas BŒUF, la cinétique d'accumulation des DC présente une allure en cloche (Figure 3).

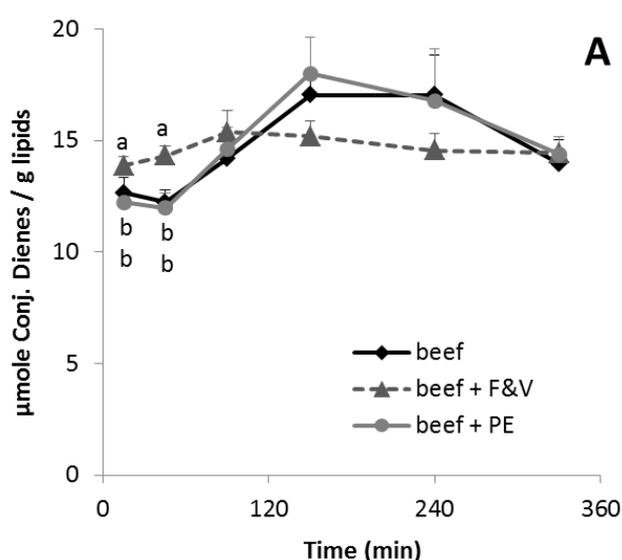


Figure 3 : Evolution des diènes conjugués dans les digestats gastriques après l'ingestion des repas BŒUF (beef), F&L (F&V) et EXTRAIT (PE) (moyenne \pm SEM, $n = 6$).

Une accumulation nulle des diènes conjugués indique des vitesses égales de formation et de décomposition des diènes conjugués. La cinétique observée indique que la vitesse de formation est supérieure à la vitesse de décomposition sur la période 45-150 min et que cette tendance s'inverse sur la fin de la digestion. La teneur maximale en DC, observée entre 150 et 240 min, correspond à une augmentation de 35% en DC. L'ajout de l'extrait phénolique à ce repas (repas EXTRAIT) n'a pas d'effet sur la cinétique d'accumulation des diènes conjugués. Quant aux F&L, ils montrent un effet inattendu : la teneur en CD est plus élevée dès le début de la digestion, sans augmentation notable au cours du temps.

Les TBARS ont été mesurés dans les mêmes digestats. Leur évolution est clairement différente de celle des diènes conjugués (Figure 4). En effet, les teneurs en TBARS augmentent continuellement quel que soit le repas sur une période d'au moins 240 min. Ce phénomène est en accord avec la dégradation continue de marqueurs primaires d'oxydation vers des marqueurs secondaires ou ultimes comme le malondialdéhyde. Il démontre clairement l'existence du processus d'oxydation lipidique *in gastro*. Néanmoins, l'ajout de F&L ou de l'extrait phénolique ralentit considérablement cette accumulation. A 240 min, les teneurs en TBARS sont significativement plus faibles pour les repas F&L et EXTRAIT

($p < 0.05$). Ainsi, les teneurs en TBARS ont été multipliées par un facteur 5 pour le repas BOEUF et seulement par un facteur 2 pour les repas F&L et EXTRAIT.

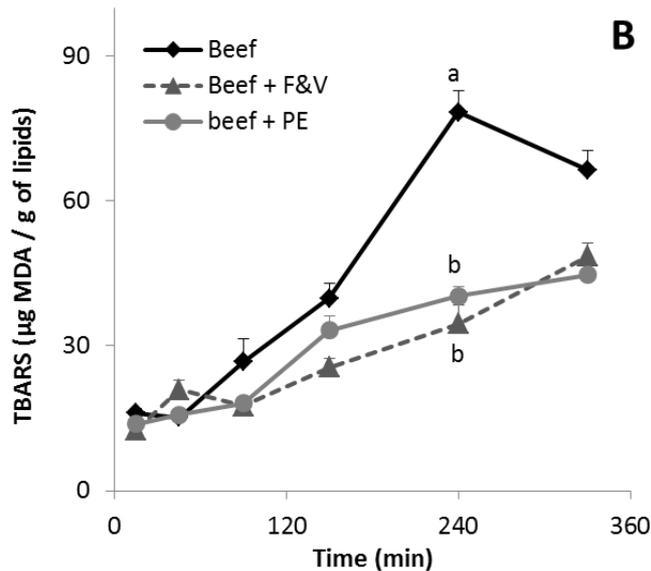


Figure 4 : Evolution des TBARS dans les digestats gastriques après l'ingestion des repas BOEUF (beef), F&L (F&V) et EXTRAIT (PE) (moyenne ± SEM, $n = 6$).

3.4 Les fruits et légumes et leurs polyphénols comme protecteur des lipides au cours de la digestion gastrique

L'huile de tournesol utilisée dans cette étude contenait 900 ppm de vitamine E. L' α -tocopherol, le constituant principal de la vitamine E dans l'huile de tournesol, est donc incapable de protéger de l'oxydation les lipides émulsifiés durant la digestion gastrique.

Les F&L et leurs flavonoïdes exercent une protection vasculaire comme l'ont mis en évidence de nombreuses études épidémiologiques. Bien que le mécanisme derrière cette association reste à démontrer, les résultats de notre étude d'intervention sont en accord avec les recommandations du PNNS3 (Programme National de Nutrition Santé, 2011-2015) qui sont de consommer au moins 5 portions de F&L par jour.

Dans l'étude, les mini-porcs recevaient un repas de type occidental associé à 2,5 portions, soit 200 g de F&L, correspondant à la moitié de l'apport journalier recommandé. Les F&L taillés en dés et l'extrait hydroacétonique contenaient 154 mg de composés phénoliques monomériques (Tableau 2), 79 mg de flavanols oligomérique (degré de polymérisation moyen = 3) ainsi que des sucres solubles et des acides aminés (22.6 g).

Comme démontré précédemment, la pomme (120 g) est une source de flavanols monomériques et oligomériques, de flavonols ainsi que de dihydrochalcones. La quetsche (40 g) contribue aux différentes classes de composés phénoliques. Quant au cœur d'artichaut (40 g), il fournit 61% (p/p) des composés phénoliques monomériques, principalement sous la forme d'acides hydroxycinnamiques. Dans l'alimentation française, les acides hydroxycinnamiques sont les composés phénoliques les plus largement consommés (599 mg/d) suivi par les flavanols oligomériques également appelés proanthocyanidines (227 mg/d) (Pérez-Jiménez *et al.*, 2011). Dans cette étude, les acides caféoylquiniques sont les contributeurs principaux dans les repas supplémentés (74%, p/p) et l'acide chlorogénique est le plus abondant constituant. Les acides caféoylquiniques et les flavanols, le second groupe majoritaire, ont en commun le motif 1,2-dihydroxyphényle à l'origine de la capacité antioxydante des composés phénoliques. Il a été rapporté que la ferrylmyoglobine MbFe(IV=O), produite par activation de la metmyoglobine MbFe(III) par les hydroperoxydes lipidiques ou le peroxyde d'hydrogène,

était efficacement réduite par les acides hydroxycinnamiques (Carlsen *et al.*, 2000; Laranjinha *et al.*, 1995) et les flavonoïdes (Jorgensen *et al.*, 1998; Lorrain, Dufour, *et al.*, 2010). Par conséquent, les composés phénoliques constitutifs des F&L et de l'extrait peuvent protéger les lipides polyinsaturés par réduction des formes hypervalentes de fer. Ces composés phénoliques sont également connus pour leur capacité à chélater les formes libres du fer. Toutes ces espèces du fer étant impliquées dans l'étape d'initiation du mécanisme de l'oxydation lipide, les composés phénoliques joueraient un rôle complémentaire de l' α -tocophérol, qui lui est connu pour réduire les radicaux peroxydes lipidiques impliqués dans la phase de propagation.

Tableau 2 : Caractérisation qualitative et quantitative de l'extrait phénolique

Composé ^a	Teneur dans l'extrait (mg) ^b	Sources végétales
3-Caffeoylquinic acid	10.85	Prune (91%), Artichaut (9%)
Dimer B	Nq	Pomme (tr.)
Dimer B1	4.86	Pomme (94%), Prune (6%)
<i>p</i> -Coumaroylquinic acid	0.17	Prune (tr.)
Catechin	4.17	Pomme (86%), Prune (14%)
Dimer B	0.83	Pomme (tr.)
Chlorogenic acid	53.37	Artichaut (71%), Pomme (28%), Prune(1%)
Dimer B2	8.16	Pomme
4-Caffeoylquinic acid	1.85	Artichaut
dimer B	1.93	Pomme (tr.)
1,3-Dicaffeoylquinic acid or cynarin	0.26	Artichaut
Epicatechin	3.83	Pomme
5- <i>p</i> -Coumaroylquinic acid	Nq	Pomme (tr.)
chlorogenic acid (CIS)	2.91	Pomme (72%), Artichaut (28%), Prune (tr.)
4- <i>p</i> -Coumaroylquinic acid	1.95	Pomme (100%), Prune (tr.), Artichaut (tr.)
3,4-Dicaffeoylquinic acid	0.59	Artichaut
3,5-Dicaffeoylquinic acid	22.73	Artichaut (99.9%), Prune (0.1%),
Quercetin hexoside (I)	0.76	Pomme
1,5-Dicaffeoylquinic acid	19.38	Artichaut
Rutin (MIN) and quercetin hexoside (II) (MAJ)	1.14	Pomme (79%), Prune (21%)
Phloretin-2'-O-xyloglucoside	8.57	Pomme
4,5-Dicaffeoylquinic acid	2.67	Artichaut
Phloridzin	3.18	Pomme

^a Assignation structurale par spectrométrie de masse. ^b Teneur déterminée par UPLC utilisant des courbes de calibration avec standards (chlorogenic acid, 3-caffeoylquinic acid, 4-caffeoylquinic acid, (+)-catechin, 3,5-dicaffeoylquinic acid, rutin, phloridzin).

Nq : non quantifiable. Tr : traces. Teneur phénolique globale dans l'extrait = 154 mg

En conclusion, notre étude démontre clairement l'existence *in vivo* d'une voie de dégradation des lipides polyinsaturés en présence de viande rouge riche en fer héminique. Elle suggère également que les polyphénols des F&L peuvent jouer un rôle protecteur vis-à-vis de ce phénomène d'oxydation. La matrice végétale ne semble pas affecter cet effet protecteur si l'on considère un marqueur final de l'oxydation lipidique comme les TBARS. Néanmoins, les F&L semblent plus protecteur que l'extrait lorsqu'un marqueur transitoire comme les diènes conjugués est considéré. La structure chimique des microconstituants antioxydants et leur bioaccessibilité respective sont des facteurs clés dans l'exercice par les F&L de leur capacité antioxydante.

4. Bioaccessibilité des composés phénoliques de fruits et légumes au cours de la digestion chez le mini-porc

Dans l'étude d'intervention présentée ci-dessus, les teneurs en composés phénoliques des digestats sont généralement plus élevées lorsque les composés phénoliques sont apportés sous forme d'extrait que de F&L (Figure 5). La matrice limite clairement la diffusion des composés phénoliques des tissus végétaux vers le milieu gastrique. Les processus physiques (mastication, péristaltisme) et chimiques (hydrolyses chimiques et enzymatiques) associés à la digestion, tout comme les procédés de transformation (cuisson), ne suffisent pas à produire une déstructuration complète des parois cellulaires et des organites contenus dans la cellule.

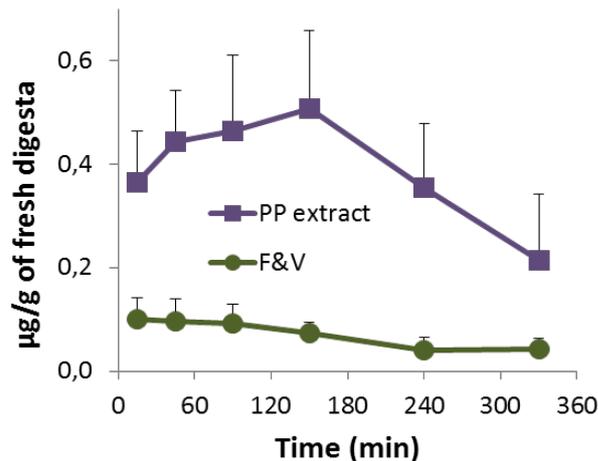


Figure 5 : Evolution des teneurs en acide 4-caféoylquinique au cours de la digestion gastrique après consommation de Fruit et Légumes (F&V) ou de l'extrait phénolique correspondant (PP extract) (moyenne \pm EC, $n = 6$).

Enfin, l'effet matrice dépend du produit végétal considéré. Il a été mis en évidence que les composés phénoliques monomériques sont plus bioaccessibles à partir de la pomme crue que de la quetsche crue. Les données sur la bioaccessibilité et la stabilité des composés phénoliques dans le tractus gastro-intestinal sont actuellement rares et issues généralement de patients iléostomisés. De nouvelles recherches devraient être conduites dans ce domaine afin de mieux comprendre l'activité des composés phénoliques lorsqu'ils sont proposés sous forme de F&L crus, transformés (ex : purée) ou sous forme d'extrait naturel.

Références bibliographiques

- Arts I.C.W., Hollman P.C.H., 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 81(1), 317S-325.
- Barbé F., Ménard O., Le Gouar Y., Buffière C., Famelart M.-H., Laroche B., Le Feunteun S., Dupont D., Rémond D., 2013. The heat treatment and the gelation are strong determinants of the kinetics of milk proteins digestion and of the peripheral availability of amino acids. *Food Chemistry* 136(3-4), 1203-1212.
- Bax M.L., Aubry L., Ferreira C., Daudin J.D., Gatellier P., Remond D., Sante-Lhoutellier V., 2012. Cooking Temperature Is a Key Determinant of in Vitro Meat Protein Digestion Rate: Investigation of Underlying Mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(10), 2569-2576.
- Borel P., Degrou A., Page D., Caris-Veyrat C., 2012. Effet de la matrice alimentaire sur la bioaccessibilité et la biodisponibilité des caroténoïdes. In : Fardet A., Souchon I., Dupont D. (Eds.), *Structure des aliments et effets nutritionnels*, Editions Quae, Paris
- Campbell J.K., Canene-Adams K., Lindshield B.L., Boileau T.W.M., Clinton S.K., Erdman J.W. Jr., 2004. Tomato phytochemicals and prostate cancer risk. *The Journal of Nutrition* 134(12 Suppl), 3486S-3492S.
- Carlsen C.U., Kroger-Olsen M.V., Bellio R., Skibsted L.H., 2000. Protein binding in deactivation of ferrylmyoglobin by chlorogenate and ascorbate. *J. Agric. Food Chem.* 48(2), 204-212.

- Crozier A., Del Rio D., Clifford M.N., 2010. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine* 31(6), 446-467.
- Dauchet L., Amouyel P., Hercberg S., Dallongeville J., 2006. Fruit and vegetable consumption and risk of coronary heart disease: A meta-analysis of cohort studies. *The Journal of Nutrition* 136(10), 2588-2593.
- Degrou A., Georgé S., Renard C.M.G.C., Page D., 2013. Physicochemical parameters that influence carotenoids bioaccessibility from a tomato juice. *Food Chemistry* 136(2), 435-441.
- Esterbauer H., Cheeseman K.H., 1994. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in enzymology* 186, 407-421.
- 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 and Function* (en révision).
- He F.J., Nowson C.A., MacGregor G.A., 2006. Fruit and vegetable consumption and stroke: meta-analysis of cohort studies. *The Lancet* 367(9507), 320-326.
- Jorgensen L.V., Skibsted L.H., 1998. Flavonoid deactivation of ferrylmyoglobin in relation to ease of oxidation as determined by cyclic voltammetry. *Free Radical Research* 28(3), 335-351.
- Kalantzi L., Goumas K., Kalioras V., Abrahamsson B., Dressman J.B., Reppas C., 2006. Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. *Pharmaceutical Research* 23(1), 165-176.
- Kanazawa K., Ashida H., 1998. Catabolic fate of dietary trilinoleoylglycerol hydroperoxides in rat gastrointestines. *Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism* 1393(2-3), 336-348.
- Kanner J., 2007. Dietary advanced lipid oxidation endproducts are risk factors to human health. *Molecular Nutrition & Food Research* 51, 1094-1101.
- Kanner J., Lapidot T., 2001. The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 31(11), 1388-1395.
- Laranjinha J., Almeida L., Madeira V., 1995. Reduction of ferrylmyoglobin by dietary phenolic-acid derivatives of cinnamic acid. *Free Radical Biology and Medicine* 19(3), 329-337.
- Lemmens L., Colle I.J.P., Van Buggenhout S., Van Loey A.M., Hendrickx M.E., 2011. Quantifying the Influence of Thermal Process Parameters on in Vitro beta-Carotene Bioaccessibility: A Case Study on Carrots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(7), 3162-3167.
- Lorrain B., Dangles O., Genot C., Dufour C., 2010. Chemical modeling of heme-induced lipid oxidation in gastric conditions and inhibition by dietary polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(1), 676-683.
- Lorrain B., Dangles O., Loonis M., Armand M., Dufour C., 2012. Dietary iron-initiated lipid oxidation and its inhibition by polyphenols in gastric conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(36), 9074-9081.
- Lorrain B., Dufour C., Dangles O., 2010. Influence of serum albumin and the flavonol quercetin on the peroxidase activity of metmyoglobin. *Free Radical Biology and Medicine* 48(9), 1162-1172.
- Min B., Nam K.C., Cordray J., Ahn D.U., 2008. Endogenous Factors Affecting Oxidative Stability of Beef Loin, Pork Loin, and Chicken Breast and Thigh Meats. *Journal of Food Science* 73(6), C439-C446.
- Page D., Van Stratum E., Degrou A., Renard C.M.G.C. 2012., Kinetics of temperature increase during tomato processing modulate the bioaccessibility of lycopene. *Food Chemistry* 135(4), 2462-2469.
- Pérez-Jiménez J., Fezeu L., Touvier M., Arnault N., Manach C., Hercberg S., Galan P., Scalbert A., 2011. Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. *The American Journal of Clinical Nutrition* 93(6), 1220-1228.
- Sesso H.D., Liu S.M., Gaziano J.M., Buring J.E., 2003. Dietary lycopene, tomato-based food products and cardiovascular disease in women. *Journal of Nutrition* 133(7), 2336-2341.
- Singh P., Goyal G.K., 2008. Dietary lycopene: Its properties and anticarcinogenic effects. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 7(3), 255-270.

Staprans I., Pan X.M., Rapp J.H., Feingold K.R., 2005. The role of dietary oxidized cholesterol and oxidized fatty acids in the development of atherosclerosis. *Molecular Nutrition & Food Research* 49(11), 1075-1082.

Suomela J.-P., Ahotupa M., Kallio H., 2005. Triacylglycerol oxidation in pig lipoproteins after a diet rich in oxidized sunflower seed oil. *Lipids* 40(5), 437-444.

Tyssandier V., Reboul E., Dumas J.F., Bouteloup-Demange C., Armand M., Marcand J., Sallas M., Borel P., 2003. Processing of vegetable-borne carotenoids in the human stomach and duodenum. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 284(6), G913-G923.

Uchida K., 2000. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radical Biology and Medicine* 28(12), 1685-1696.

West C.E., Castenmiller J., 1998. Quantification of the "SLAMENGI" factors for carotenoid bioavailability and bioconversion. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 68(6), 371-377.

Williams M.J.A., Sutherland W.H.F., McCormick M.P., de Jong S.A., Walker R.J., Wilkins G.T., 1999. Impaired endothelial function following a meal rich in used cooking fat. *Journal of the American College of Cardiology* 33(4), 1050-1055.