



HAL
open science

Effets de la salive sur la digestion gastrique des protéines de l'Emmental

Sylvaine Ramsamy

► **To cite this version:**

Sylvaine Ramsamy. Effets de la salive sur la digestion gastrique des protéines de l'Emmental. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. hal-02929590

HAL Id: hal-02929590

<https://hal.inrae.fr/hal-02929590>

Submitted on 3 Sep 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



université
de **BORDEAUX**



MASTER NUTRITION ET SCIENCES DES ALIMENTS

Rapport de stage M2

RAMSAMY Sylvaine

Effets de la salive sur la digestion gastrique des protéines de l'Emmental

2019-2020

Responsables de Stage : Steven LE FEUNTEUN et Martine MORZEL
Laboratoire d'accueil : INRAE - UMR STLO



REMERCIEMENTS

Au terme de ce stage, je tiens à remercier toutes les personnes qui y ont contribué de près ou de loin.

Je remercie, tout d'abord, Madame Hélène LUCAS, présidente du centre Bretagne-Normandie de l'INRAE, pour m'avoir permis de réaliser mon stage de fin d'études au sein de son centre.

Merci à Monsieur Yves LE LOIR, directeur de l'UMR Science et Technologie du Lait et de l'Œuf (STLO) à Rennes, pour son accueil au sein de son unité et sa bienveillance, ainsi qu'à Monsieur Didier DUPONT, responsable de l'équipe Bioactivité et Nutrition, pour sa sympathie et ses conseils.

Mes remerciements se portent particulièrement à mes responsables de stage, Monsieur Steven LE FEUNTEUN et Madame Martine MORZEL, tous les deux chargés de recherche au sein de l'UMR STLO. Merci pour leur patience avec moi, pour toutes les connaissances qu'ils m'ont apportées, pour leurs directives toujours pertinentes pour l'avancée de mes expérimentations ainsi pour tous les bons moments qui ont marqué mon stage.

Je tiens également à remercier Madame Françoise NAU, professeure en sciences des aliments à l'Agrocampus Ouest, pour son aide, ses nombreux conseils que je n'oublierai pas et sa confiance.

Je voudrais également remercier Monsieur Henry KROMM, mon tuteur de l'ENSCBP, pour sa disponibilité et sa réactivité.

J'adresse aussi des remerciements à toute l'équipe de l'UMR STLO ainsi qu'à celle de l'Agrocampus Ouest, qui ont toujours été là pour m'accompagner et me conseiller lors de mes différentes expérimentations.

Je n'oublie pas les doctorants et les post-docs dont j'ai pu faire la connaissance lors de mon stage, Léa, Jun, François, Rima, et tous les autres, merci pour leur accueil chaleureux, et leur gentillesse.

Je ne pouvais pas finir mes remerciements, sans remercier mes parents qui malgré la distance sont toujours là pour moi quelles que soient les circonstances, qui m'encouragent et me soutiennent dans toutes mes décisions.

SOMMAIRE

I. <u>Introduction bibliographique</u>	p.1
1-1 Contexte général de l'étude	p.1
1-2 Introduction bibliographique au sujet	p.1
1-3 Hypothèses et objectifs scientifiques du stage	p.3
II. <u>Matériels et méthodes</u>	p.7
2-1 Digestions gastriques <i>in vitro</i> semi-dynamique à l'aide d'un pH-stat	p.7
2-1.1 Préparation des particules de fromage	p.7
2-1.2 Préparation des fluides gastriques simulés	p.9
2-1.3 Phase orale	p.9
2-1.4 Incorporation de la salive et des sucs gastriques basaux	p.11
2-1.5 Digestion gastrique <i>in vitro</i> semi-dynamique au pH-stat	p.11
2-2 Dynamique de protéolyse d'après les données de pH-stat	p.11
2-3 Analyses des prélèvements	p.13
2-3.1 Clarification et augmentation du pH des prélèvements	p.13
2-3.2 Dosage des peptides dans le surnageant en spectroscopie UV	p.15
2-3.2.1 Principe de la méthode	p.15
2-3.2.2 Conditions opératoires	p.15
2-3.3 Dosage des amines libres dans le surnageant à l'aide de la méthode OPA	p.19
2-3.3.1 Principe de la méthode	p.19
2-3.3.2 Conditions opératoires	p.19
III. <u>Résultats</u>	p.23
3-1 Evolution du degré d'hydrolyse d'après les données du pH-stat	p.23
3-2 Libération des peptides dans le surnageant	p.23
3-3 Evolution de la quantité de NH ₂ dans le surnageant	p.25
3-4 Evolution du degré d'hydrolyse d'après les résultats d'OPA et l'absorbance à 275 nm	p.25
IV. <u>Discussion</u>	p.27
<u>Conclusion</u>	p.35
<u>Références bibliographiques</u>	
<u>Evaluation des compétences</u>	

LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

Figure 1 : Stéréogramme montrant la structure globale de la pepsine humaine selon Fujinaga <i>et al.</i> ³	2
Figure 2 : Schématisation des phases de la digestion <i>in vitro</i> semi-dynamique selon Mulet-Cabero <i>et al.</i> ⁹	6
Figure 3 : Schématisation des étapes de broyage et de tamisage des différentes fractions du fromage	6
Figure 4 : Présentation du pH-stat	8
Figure 5 : Montage du procédé de filtration de la phase liquide du prélèvement après centrifugation	14
Figure 6 : Courbe d'étalonnage obtenue à partir de la solution de EAS par lecture spectrométrique en UV (275 nm)	14
Figure 7 : Courbe d'étalonnage obtenue à partir de la solution de méthionine par lecture à 340 nm par la méthode OPA	18
Figure 8 : Exemple d'une microplaque de lecture en OPA	18
Figure 9 : Evolution du pH en fonction du temps au cours des digestions, obtenu à partir des données du pH-stat.	22
Figure 10 : Evolution du volume de titrant au cours des digestions, obtenu à partir des données du pH-stat ...	22
Figure 11 : Evolution du DH en fonction du temps pour les 4 conditions de digestion réalisées au pH-stat.....	22
Figure 12 : Evolution de la concentration de peptides (A) et de la masse de peptides (B) libérés dans le surnageant au cours de la digestion, calculées à partir des données de la lecture à 275 nm.	24
Figure 13 : Evolution de la quantité de NH ₂ présent dans le surnageant en fonction du temps, calculée à partir des données de la lecture en OPA	24
Figure 14 : Evolution de la quantité de NH ₂ par masse de peptides présent dans le surnageant en fonction du temps en considérant le point de départ à 15 min.....	24
Figure 15 : Evolution du DH en fonction du temps pour les 4 conditions de digestion, calculé à partir des données des lectures spectrométriques	26
Figure 16 : Activité de la pepsine porcine en fonction du pH selon Kondjoyan <i>et al.</i> ¹⁹	26
Figure 17 : Comparaison des résultats calculés par deux méthodes (pH-stat ou dosages spectrométriques).....	28
Tableau I : Préparation des fluides digestifs simulés selon Minekus <i>et al.</i> ¹	8
Tableau II : Facteurs de dilutions des protéines de fromage dans la solution de EAS	14
Tableau III : Facteurs de dilution appliqués lors de la lecture à 275 nm en fonction des prélèvements	16
Tableau IV : Récapitulatif de la composition des différentes solutions préparées	16

LISTE D'ABREVIATIONS

α_{COOH}	Degré de dissociation moyen des R-COOH
AA	Acides Aminés
Abs	Absorbance
AG	Acides Gras
AS	Solution d'alcalase et de salive
C	Concentration (mol/L ou g/L)
DH	Degré d'Hydrolyse (%)
DTT	Dithiothréitol
EAS	Mélange d'emmental, d'alcalase, et de salive
eSGF	electrolyte Simulated Gastric Fluid
ε	Coefficient d'extinction spécifique ($\text{g}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ou $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)
GE	Gastric Emptying (vidange gastrique)
HCl	Acide chlorhydrique / Chlorure d'hydrogène
h_{tot}	Nombre de liaisons peptidiques (méqv/g protéine)
l	Trajet optique (cm)
LP	Nombre de liaisons peptidiques (mmol)
M	Masse molaire (g/mol)
m	Masse (g)
n	Quantité de matière (mmol)
$N_{\text{caséines}}$	Nombre moyen d'AA par caséines (mol NH_2/g)
OPA	Ortho-phthalaldéhyde
pH	potentiel Hydrogène
P_{prot}	Pourcentage de protéines dans le fromage (%)
Réf	Référence
SDS	Sodium Docedyl Sulfate
SGF	Simulated Gastric Fluid
SIF	Simulated Intestinal Fluid
TBS	Tétraborate de sodium
UMR STLO	Unité mixte de recherche Science et Technologie du Lait et de l'Œuf
UV	Ultraviolet
V	Volume (mL ou L)
X	Quantité moyenne de NH_2 par masse (mol NH_2/g)

PREAMBULE

Mon stage de fin d'études de six mois entre dans le cadre de la préparation d'un double diplôme : diplôme d'ingénieur en Agroalimentaire-Génie Biologique spécialité Innovation et Nutrition Humaine et diplôme de master en Nutrition et Sciences des Aliments.

En dépit des circonstances liées au Covid-19, mon stage a débuté en télétravail le 23 mars 2020, lors du confinement. Je n'ai pu intégrer mon laboratoire et commencer mes expérimentations qu'à partir du 25 mai 2020.

Le programme de stage prévu initialement qui portait sur l'étude des interactions entre constituants au cours de la digestion gastrique de repas associant pain, vin et fromage a dû être ajusté. Mon sujet de stage ainsi que les objectifs fixés ont été adaptés à la durée consacrée pour se focaliser sur l'étude des effets de la salive sur la digestion gastrique des protéines de l'Emmental.

I. Introduction bibliographique

1-1 Contexte général de l'étude

La digestion consiste en la déconstruction séquentielle des aliments par différents mécanismes (physiques, enzymatiques, et chimiques) et en l'absorption des nutriments par l'organisme. Or, si l'absorption des nutriments se réalise dans l'intestin grêle, il est aujourd'hui admis que ces cinétiques d'assimilation sont fortement gouvernées par les étapes en amont : la phase orale, que l'on peut étudier assez facilement, et la phase gastrique qui est plus difficile à étudier pour des raisons pratiques évidentes.

L'équipe de recherche « Bioactivité et Nutrition » de l'UMR STLO où j'ai réalisé mon stage, étudie les liens entre la structure des aliments et la santé afin de maximiser les bénéfices de l'alimentation en termes de valeur nutritionnelle et biologique. Sa principale préoccupation est de comprendre les mécanismes de la digestion.

1-2 Introduction bibliographique au sujet

L'une des approches utilisées pour l'étude de la digestion consiste en l'analyse du devenir des aliments au cours des différentes étapes de la digestion. Ce type d'études peut être réalisé *in vivo* sur l'être humain, mais uniquement pour des expériences peu contraignantes et peu invasives pour les volontaires. La recherche scientifique a donc souvent recours à l'expérimentation sur des modèles animaux. Néanmoins, l'expérimentation animale pose également des questions éthiques importantes. De plus en plus de laboratoires utilisent donc des expériences de digestion *in vitro* pour leurs études.

La digestion *in vitro* consiste à simuler le processus oral, les phases gastrique et intestinale, et parfois la fermentation intestinale en tentant d'imiter les conditions physiologiques *in vivo*¹. Ces digestions ont pour avantage d'éviter les problèmes éthiques, d'être reproductibles, répétables et moins coûteuses que les études *in vivo*.

De très nombreuses études de digestion *in vitro* ont déjà été réalisées. Dans la majorité des cas, elles sont expérimentées au niveau intestinal. Pour les digestions au niveau gastrique, la plupart des études sont réalisées avec un pH gastrique constant et négligent presque toujours la salive qui est pourtant présente *in vivo* dans l'estomac. Par exemple, il n'a été montré que très récemment une contribution importante de l'amylase salivaire à la digestion gastrique de l'amidon parce que l'acidification est très progressive. En effet, les sécrétions acides de l'estomac ne permettent pas une acidification immédiate du contenu, mais au contraire une acidification progressive du pH du repas (typiquement pH 6) à un pH d'environ 2 en plus d'une heure². Nous pouvons également se poser des questions sur d'autres effets potentiels de la salive dans l'estomac, notamment sur la digestion gastrique des protéines.

La protéolyse consiste en l'hydrolyse enzymatique des liaisons peptidiques des protéines (à l'aide de protéases), afin d'obtenir des fragments de protéines (peptides, acides aminés (AA)...), ce qui permet leur absorption par l'organisme.



Figure 1 : Stéréogramme montrant la structure globale de la pepsine humaine selon Fujinaga *et al.*³

Dans l'estomac, la protéolyse est réalisée par la pepsine (Figure 1). C'est une endoprotéase aspartique qui hydrolyse de façon préférentielle les liaisons peptidiques situées du côté N-terminal des AA aromatiques³.

La salive joue un rôle important dans la prise alimentaire, comme par exemple lubrifier le bol alimentaire, ce qui facilite sa déglutition⁴. Elle possède aussi des activités enzymatiques (lipolytiques et amylolytiques notamment) qui potentiellement pourraient jouer un rôle dans la digestion des aliments si celles-ci perdurent dans l'estomac. A contrario, la salive est également riche en inhibiteurs de protéases (ex : cystatines, serpins)⁵, ce qui peut faire s'interroger sur son action sur la protéolyse digestive bien qu'à notre connaissance, il n'y a pas d'études qui décrivent des inhibiteurs de protéases aspartiques dans la salive.

Par ailleurs, la salive peut agir d'autres façons sur la digestion gastrique, comme par exemple via son effet tampon ou à sa composition en composés azotés et en électrolytes. Ce pouvoir tampon de la salive aurait pour effet de ralentir la cinétique de protéolyse par la pepsine, qui a un optimum d'activité à pH 2. La salive pourrait également augmenter la viscosité du chyme, en raison de sa concentration en protéines fortement glycosylées telles que les mucines par exemple. A nouveau, nous pouvons nous demander si ces effets sont susceptibles de ralentir la protéolyse digestive en limitant les interactions enzymes-substrats.

Enfin, d'autres composants de l'alimentation peuvent interagir sur la digestion. Par exemple, il a été démontré que les polyphénols / tanins (présent dans le vin, le thé ou les jus par exemple) pourraient avoir un impact sur les enzymes digestives (notamment enzymes protéolytiques)⁶. Une autre étude a mis en évidence la très grande affinité de certaines protéines salivaires (PRPs) pour les polyphénols / tanins⁷. Cela permet de nous interroger sur le rôle potentiellement protecteur de la salive contre une altération de ces molécules lors de la digestion.

1-3 Hypothèses et objectifs scientifiques du stage

Nous pouvons faire l'hypothèse que la salive aurait des actions sur la digestion gastrique des protéines. L'effet tampon de la salive pourrait ralentir l'acidification de l'estomac ce qui prolongerait la digestion et retarderait la protéolyse, car la pepsine est inactive à pH neutre et a un pH optimum d'activité autour de 2⁸. De plus, les composants de la salive (protéines, inhibiteurs...) pourraient agir sur la protéolyse en empêchant le contact entre la pepsine et les protéines et/ou en agissant sur la consistance du chyme.

Mon stage vise à étudier l'effet de la salive sur la digestion de fromage par la pepsine au cours de digestions gastriques *in vitro* semi-dynamiques. Il vise plus particulièrement à savoir si la présence de salive peut avoir une influence directe sur la protéolyse lors de la digestion gastrique. Cette étude est également un prérequis à l'étude d'effets indirects de la salive sur la protéolyse gastrique, comme par exemple en présence de tanins.

Donc, l'un des objectifs principaux est d'évaluer l'influence de la salive sur la protéolyse gastrique des protéines présentes dans le fromage.

Le fromage a été choisi comme aliment test, car il est très bien connu du laboratoire où j'ai réalisé mon stage. Il fait partie des aliments pour lequel il faut incorporer beaucoup de salive, il est riche en protéines (utile pour notre étude) et en lipides (utile pour d'autres études sur la lipolyse gastrique). Le fromage sélectionné pour l'étude devait avoir une évolution lente lors de sa conservation, sa fracture en morceaux devait être discernable lors de la phase orale, et il devait être assez résistant pour avoir une dégradation lente au cours de la digestion gastrique. Les fromages de variétés pâtes molles (camembert, munster), persillées (roquefort) et pâtes fraîches (Petit Suisse, Fêta) ont donc été écartés, au profit des fromages de type pâtes pressées cuites (Comté, Parmesan, Emmental) ou pâtes pressées non cuites (tomme de Savoie, Edam). Lors des essais préliminaires de formation de bols *in vivo* (en bouche) et *in vitro* (stomacher, blenders, découpe manuelle au couteau), le fromage qui a donné les morceaux les plus gros, les moins collants et les plus discernables était un Emmental.

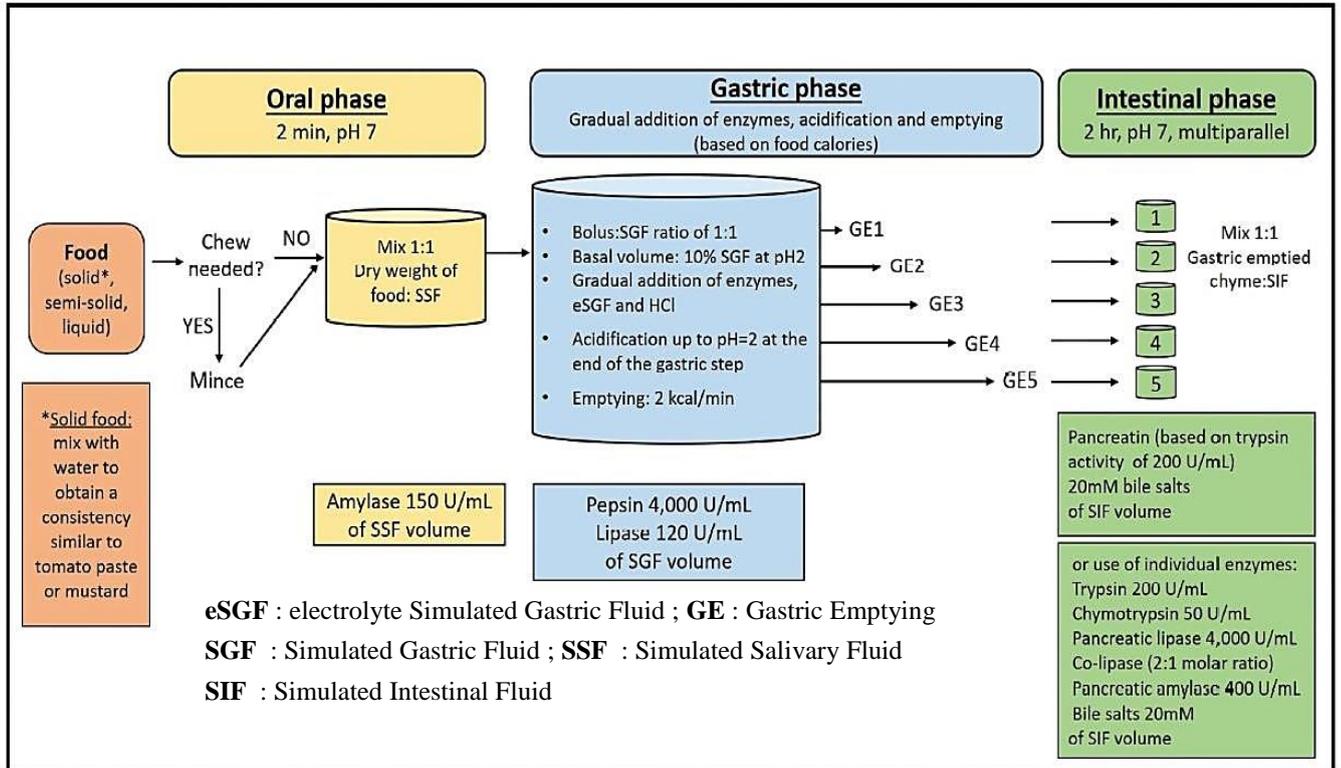


Figure 2 : Schématisation des phases de la digestion *in vitro* semi-dynamique selon Mulet-Cabero *et al.*⁹

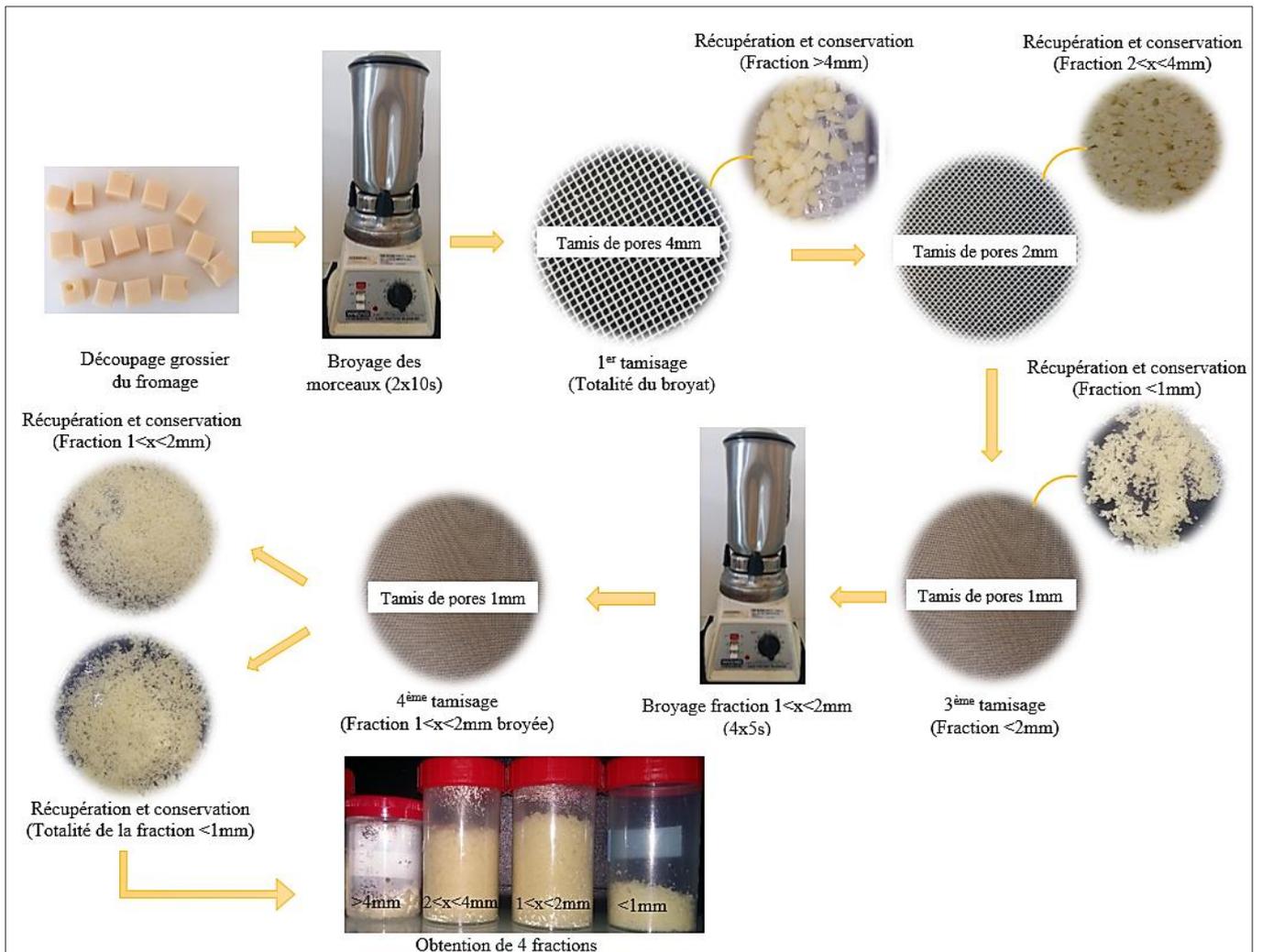


Figure 3 : Schématisation des étapes de broyage et de tamisage des différentes fractions du fromage

II. Matériels et méthodes

Le protocole de digestion gastrique *in vitro* semi-dynamique qui a été utilisé lors de mon stage se base sur celui décrit dans l'article de Mulet-Cabero *et al.*⁹ pour la phase gastrique, et dont la

Figure 2 schématise les grands principes. Nous avons apporté 2 principales adaptations en utilisant de la vraie salive et en ne réalisant pas de vidange gastrique. Nous avons utilisé un appareil de pH-stat (titrateur automatique acide/base) contrôlé par ordinateur avec un bécher double enveloppe thermostaté à 37°C, équipé d'un système d'agitation magnétique et d'orifices pour la mesure de pH, l'ajout des sécrétions et la collecte d'échantillons.

Pour simuler la phase orale, l'Emmental a été haché, mélangé à de la salive humaine et à de l'eau distillée. Pour la quantité de salive humaine, nous avons décidé de prendre les deux extrêmes, c'est-à-dire 0 % de salive (correspond à quelqu'un qui ne salive pas) et 100 % de salive (correspond à quelqu'un qui salive beaucoup)¹⁰ soit un ratio 1 : 1 avec la quantité de fromage.

Au niveau de la phase gastrique, le pH du bécher a été décroissant progressivement afin d'atteindre pH 2 en 90 minutes. Toutes les 15 minutes, des prélèvements dans le surnageant ont été effectués en vue d'analyses, puis une solution de pepsine a été ajoutée pour simuler la sécrétion enzymatique.

4 conditions de digestion ont été réalisées :

- Pas de salive (remplacée par de l'eau) et pas d'ajout de pepsine (0 % salive sans pepsine)
- 1 mL de salive pour 1 g de fromage et pas d'ajout de pepsine (100 % salive sans pepsine)
- Pas de salive (remplacée par de l'eau) et ajout de pepsine progressif (0 % salive + pepsine)
- 1 mL de salive pour 1 g de fromage et ajout de pepsine progressif (100 % salive + pepsine)

Les conditions avec ajout de pepsine ont été réalisées en triplicata alors que ceux sans ajout de pepsine n'ont été réalisés qu'en duplicata.

2-1 Digestions gastriques *in vitro* semi-dynamiques à l'aide d'un pH-stat

2-1.1 Préparation des particules de fromage

Pour reproduire la distribution de tailles de particules observées *in vivo* lors de la déglutition¹¹, l'Emmental (marque CORA) a été découpé grossièrement avant d'être haché successivement deux fois pendant 10 secondes en position High à l'aide d'un blender à lame (8010S serie, Waring Laboratory Science). La totalité du broyat a été tamisée successivement à l'aide de tamis de pores 4 mm, 2 mm et 1 mm respectivement. Les particules qui ne traversaient pas les pores ont été récupérées et conservées afin de former une fraction. Le dernier tamisage a permis d'obtenir deux fractions : une fraction < 1 mm qui est conservée (les particules qui ont traversé le tamis) et une fraction 1 < x < 2 mm (les particules qui n'ont pas traversé le tamis) qui a été à nouveau broyée 4 fois 5s. Cet ultime broyat de fromage a été tamisé une nouvelle fois avec le tamis de pores 1 mm ce qui a permis d'obtenir une fraction de < 1 mm plus importante que précédemment (Figure 3). Au final, 4 fractions de tailles ont été obtenues : > 4 mm, 2 < x < 4 mm, 1 < x < 2 mm et < 1 mm. Pour obtenir des morceaux de fromage plus gros, des cubes de fromage d'environ 5 mm d'arête ont été découpés au couteau.

Tableau I : Préparation des fluides digestifs simulés selon Minekus *et al.*¹

Produit	Concentration (mol/L)	SGF 1,25x	SGF 1x	SGF 1x 0,4M	SGF 1x 0,01M
KCl	0,5	8,625 mL	-	-	-
KH ₂ PO ₄	0,5	1,125 mL			
NaHCO ₃	1	15,625 mL			
NaCl	2	14,75 mL			
MgCl ₂ , 6H ₂ O	0,15	0,5 mL			
(NH ₄) ₂ CO ₃	0,5	0,625 mL			
SGF 1,25x			400 mL	1600mL	80 mL
HCl	4		-	200 mL	-
HCl	1		-		1 mL
Eau		QSP 500 mL	QSP 500 mL	QSP 2L	QSP 100 mL

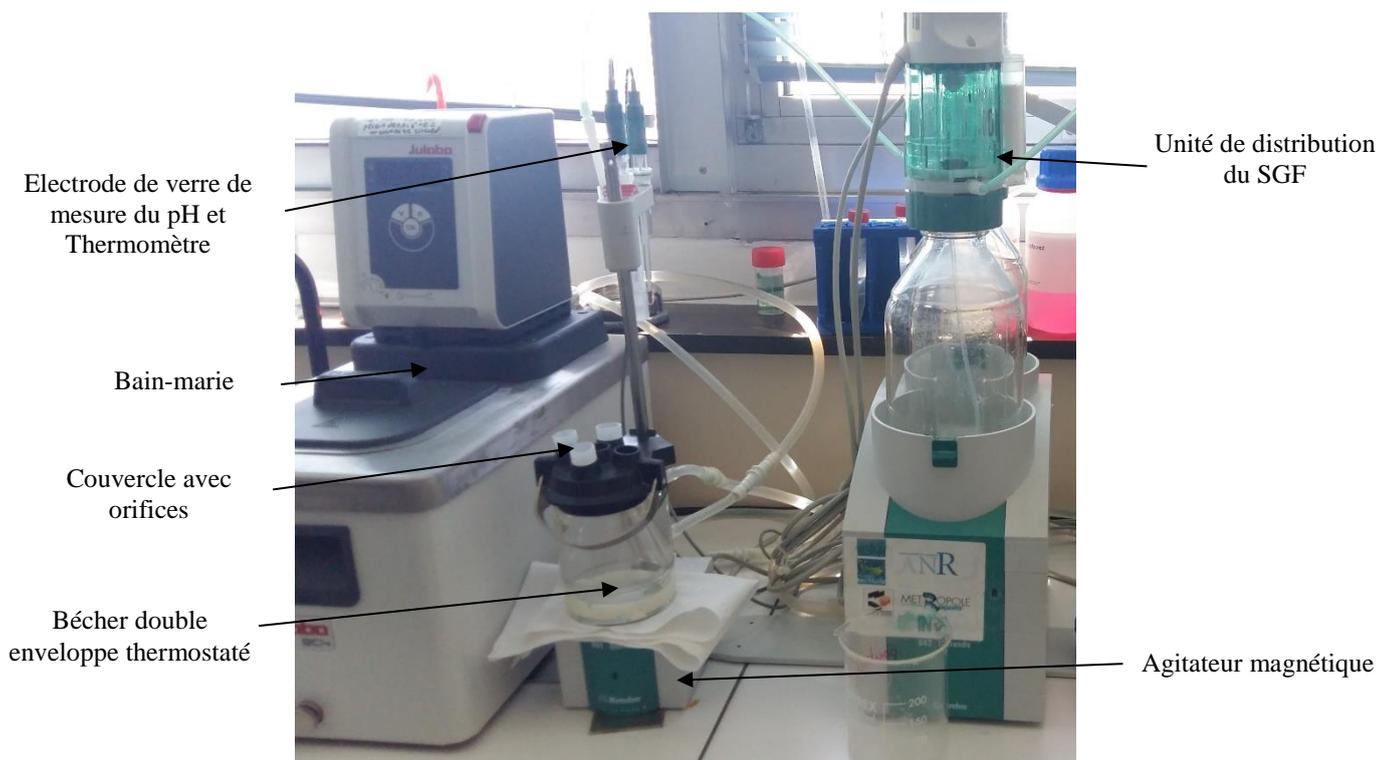


Figure 4 : Présentation du pH-stat

2-1.2 Préparation des fluides gastriques simulés

Pour simuler le fluide gastrique (SGF), des solutions d'électrolytes concentrées ont été préparées et mélangées selon le protocole de Minekus *et al.*¹ (Tableau I). Cette solution d'électrolyte (eSGF) a ensuite été utilisée pour préparer :

- Une solution de SGF à 0,4M HCl pour simuler la sécrétion gastrique d'HCl arrivant dans l'estomac au cours de la digestion, tout en servant de titrant lors des expériences de pH-stat. La concentration de 0,4M d'HCl a été définie afin que le volume total ajouté soit d'environ 20 mL pour doubler le volume gastrique initial, comme préconisé dans Mulet-Cabero *et al.*⁹.

- Une solution de SGF à 0,01M HCl pour simuler le liquide gastrique de base qui se situe déjà dans l'estomac lors de l'arrivée du bol alimentaire.

- Une solution de SGF contenant 42 000 U/mL de pepsine pour simuler l'apport progressif d'enzyme. Selon l'article de Mulet-Cabero *et al.*⁹, l'activité de la pepsine (P6887, Sigma-Aldrich) dans le bécher (Réf : 6.1418.220, Metrohm) doit être autour de 2000 U/mL en fin de digestion (pH = 2). L'activité enzymatique de notre solution a été définie en fixant le volume total à ajouter à 2 mL, en estimant un volume final de 42 mL, et en sachant que l'activité de la pepsine vendue sous forme de poudre était de 3 355 U/mg (résultat obtenu en utilisant le protocole décrit dans Minekus *et al.*¹). Cette solution a été préparée quelques minutes avant son utilisation afin de conserver son activité protéolytique. 10 % des 2 mL de la solution de pepsine ont été mis dans le bécher au départ, soit 8 400 U. Les 90 % restant ont été ajoutés, toutes les 15 minutes pendant 90 minutes par ajout de 300 µL soit 12 660 U à chaque fois.

2-1.3 Phase orale

D'après des tests préliminaires, la quantité de fromage idéal pour réaliser notre digestion *in vitro* semi-dynamique est de 8 g. Une quantité de fromage trop élevée ou trop basse provoque une mauvaise agitation du contenu du bécher et donc une protéolyse inégale.

Ainsi, à partir des fractions de fromages réalisées, des distributions de particules de fromage de 8 g ont été reconstituées en mélangeant 10 % de la fraction < 1 mm, 40 % de la fraction 1 < x < 2 mm, 30 % de la fraction 2 < x < 4 mm et 20 % de cubes de 5 mm d'arrête. Ces distributions, qui correspondent à la littérature *in vivo*¹¹, ont été conservées au congélateur avant leur utilisation.

Comme proposé dans l'article de Mulet-Cabero *et al.*, nous avons choisi de simuler une boisson (eau) avec un ratio volumique 1 : 1 entre fromage et boisson ce qui correspond donc à 8 mL d'eau. L'Emmental « pur » ne marche pas bien, et provoque une mauvaise agitation du bécher. De plus, dans la vraie vie, on boit lorsqu'on consomme des aliments solides/secs.

2-1.4 Incorporation de la salive et des sucs gastriques basaux (durée : 2,5 min)

Cette phase se déroule dans le bécher double enveloppe thermostaté à 37°C du pH-stat (842 Titrande, Réf : 2.842.0010, Metrohm), qui est sous agitation (vitesse 3) et qui est contrôlé par ordinateur (logiciel *tiamo*TM 2.5, Metrohm) (Figure 4). Comme nous pouvons le voir sur la

Figure 2, il y a un volume basal de 10 % de SGF à pH 2 ce qui correspond au fluide SGF 0,01M HCl. C'est la première solution qui est insérée dans le bécher. Puis, 10 µL de CaCl₂ à 0,3M sont ajoutés. Ensuite, ce sont les 8 mL d'eau (pour simuler une boisson) qui ont été ajoutés.

Dans un contenant à part, les 8 mL de salive humaine (991-05-P, Lee Biosolutions) (conditions avec salive) ou 8 mL d'eau (conditions sans salive) ont été mélangés, manuellement à la spatule, aux 8 g de fromage pendant environ 20 secondes avant d'être versés dans le bécher du pH-stat.

Enfin, 200 µL de la solution de pepsine ont été ajoutés dans le bécher (si l'essai contient de la pepsine), c'est à ce moment qu'est réalisé le premier prélèvement (celui à t=0 min). L'agitation du bécher est arrêtée et après environ 15 secondes, 1 mL de surnageant est prélevé et mis dans un eppendorf. Si l'essai contient de la pepsine, 10 µL d'une solution d'inhibiteur de pepsine à 0,5 g/L (poudre de pepstatine (P5318, Sigma-Aldrich) diluée dans un mélange méthanol : acide acétique 9 : 1) sont ajoutés avant de stocker au froid le prélèvement. L'agitation du bécher est redémarrée et l'expérience de digestion gastrique *in vitro* est démarrée.

2-1.5 Digestion gastrique *in vitro* semi-dynamique au pH-stat (durée : 120 min)

Le pH-stat permet l'étude d'une cinétique réactionnelle (ex : cinétique enzymatique) à un pH constant qui est maintenu grâce à l'ajout de titrant. Ainsi, il est possible de calculer la cinétique d'une réaction en se basant sur la quantité de titrant consommée en fonction du temps. L'hydrolyse des protéines par la pepsine peut être suivie par cette méthode à pH acide, car les amines formées lors de l'hydrolyse d'une liaison peptidique se protonent ($pK_a > pH$) alors que les acides carboxyliques coproduits ne libèrent pas ou partiellement leurs protons ($pK_a < \text{ou } \sim pH$). Globalement, des protons du milieu réactionnel sont consommés et peuvent donc être titrés par une solution acide.

Par contre, dans notre étude, nous désirions atteindre le pH 2 en 90 min et maintenir ce pH pendant 30 min. Pour ce faire, nous sommes partis du pH initial du mélange, avons bridé le débit maximal de la pompe délivrant le titrant (SGF à 0,4M HCl) à 0,28 mL/min. Ce débit ainsi que la molarité du titrant ont été déterminés à partir de tests préliminaires. Afin d'être cohérent avec les facteurs de dilution de l'article de Mulet-Cabero *et al.*⁹, le volume de la solution titrée doit être proche du volume total du bécher de départ pour avoir un rapport final de 1 : 1.

2-2 Dynamique de protéolyse d'après les données de pH-stat

A partir du logiciel *tiamo*, un tableau résumant les données (temps, pH et volume de titrant cumulé) a été obtenu pour chaque digestion.

Pour déterminer le DH des protéines du fromage dans le surnageant, il a fallu premièrement calculer la masse de protéines du fromage utilisé (m_{prot}) :

(1)	$m_{\text{prot}} = m_f \times P_{\text{prot}}$	m_{prot} : masse de protéines du fromage (g)
		m_f : masse de fromages (g)
		P_{prot} : pourcentage de protéines dans le fromage (%)

Ainsi que le nombre de liaisons peptidiques dans le surnageant (LP) en fonction du nombre total de liaisons peptidiques (h_{tot}) du fromage. Nous avons pris un h_{tot} de 8 méqV/g protéine.

(2)	$LP = m_{\text{prot}} \times h_{\text{tot}}$	LP : nombre de liaisons peptidiques dans le surnageant (mmol)
		m_{prot} : masse de protéines de fromage (g)
		h_{tot} : nombre total de liaison peptidiques par g de protéines (méqV/g)

Le DH dans le surnageant peut se calculer avec la formule suivante :

(3)	$DH (\%) = \frac{C_{\text{titrant}} \cdot (V_P - V_{SP})}{LP} \times \frac{1}{1 - \alpha_{\text{COOH}}} * 100$	C_{titrant} : Concentration molaire du titrant (M)
		V_P : Volume de titrant en présence de pepsine à un pH donné (mL)
		V_{SP} : Volume de titrant en l'absence de pepsine à un pH donné (mL)
		LP : nombre de liaisons peptidiques dans le surnageant (mmol)
		α_{COOH} : degré de dissociation moyen des R-COOH

Par simplicité, nous avons estimé que $\alpha_{\text{COOH}} = 0$ à tous les pH (donc le deuxième terme de la formule disparaît). Si cela semble acceptable pour $\text{pH} \leq 2.5$, cela n'est pas le cas pour les $\text{pH} > 2.5$. Toutefois, l'étude de Mat *et al.* à montrer que cette simplification reste acceptable dans notre cas d'étude, car l'hydrolyse par la pepsine est faible pour $\text{pH} \geq 4$ et que α_{COOH} reste inférieur à 0.5^{12} .

Il est à noter que les instants de mesures, les volumes de titrant et les valeurs de pH enregistrés par l'appareil pH-stat dans des conditions dynamiques de pH variaient d'une expérience à l'autre. Pour utiliser l'équation (3), il était donc nécessaire de réaliser un traitement des données pour remettre toutes les courbes sur une base commune de temps et de pH. Les principales étapes de ces traitements étaient les suivantes : les valeurs de pH enregistrées ont été lissées avec une moyenne mobile sur 60 points, ce qui correspond à un intervalle de 1 min (fréquence d'acquisition des données de 1 s^{-1}). Les volumes et les valeurs de pH ont ensuite été interpolés linéairement toutes les minutes de 0 à 120 minutes pour permettre le calcul des moyennes et des écarts-types en fonction du temps sur les répliques pour chaque ensemble d'expériences. Les temps et les volumes ont enfin été linéairement interpolés aux pH moyens des essais « 0 % salive en présence de pepsine » pour permettre l'emploi de l'équation (3). L'ensemble de ces traitements a été réalisé à l'aide du logiciel MATLAB (The MathWorks Inc., Natick, USA).

2-3 Analyses des prélèvements

2-3.1 Clarification et augmentation du pH des prélèvements

Tous les 15 min, 1 mL de surnageant a été prélevé en effectuant la même procédure que pour le prélèvement à $t=0$ min. Juste après le redémarrage de l'agitation, 300 μL de la solution de pepsine sont ajoutés (condition avec pepsine). A la fin de la digestion ($t=120$ min), un dernier prélèvement est effectué. Pour les essais qui contenaient de la pepsine, 10 μL de la solution de pepstatine a été utilisé pour stopper la protéolyse dans les échantillons prélevés.



Figure 5 : Montage du procédé de filtration de la phase liquide du prélèvement après centrifugation

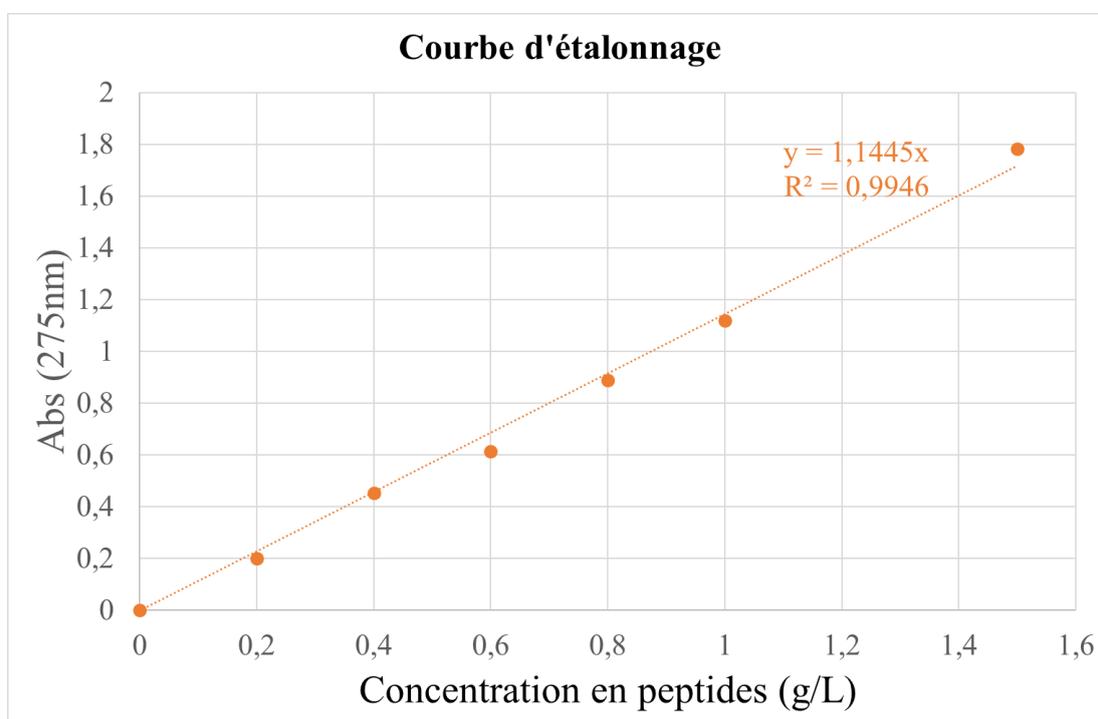


Figure 6 : Courbe d'étalonnage obtenue à partir de la solution de EAS par lecture spectrométrique en UV (275 nm)

Tableau II : Facteurs de dilutions des protéines de fromage dans la solution de EAS

Concentration en protéines de la solution EAS (g/L)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,5
Facteur de dilution des protéines dans la solution EAS (f_{EAS})	0	62,8	31,4	20,93	15,7	12,56	8,37

Une fois la digestion au pH-stat effectuée, les prélèvements ont été centrifugés (Microcentrifugeuse Micro Star 17R, Réf : 521-1647FR, VWR) pendant 10 min à 4°C à 5000g. Cette centrifugation a permis d'obtenir trois phases : un culot avec des particules solides, une phase liquide limpide intermédiaire et une phase grasse au-dessus.

La phase liquide a été récupérée à l'aide d'une pipette pasteur en verre en traversant la phase grasse. Cependant, une partie de la phase grasse s'est retrouvée dans notre prélèvement et le rendait trouble visuellement. Pour éviter que ces particules de matières grasses interfèrent lors des mesures en spectroscopie, les prélèvements ont été filtrés à l'aide d'un filtre possédant une membrane avec des pores de 0,8 µm (Membrane Sterile - 0.8 µm, 25 mm, PN 4618, PALL), insérée sur une seringue de 1 mL (Réf : SS+01H1, TERUMO) et reliée à une aiguille (18G 1,2 x 40 mm, TERUMO) pour une meilleure précision lors de la récupération du filtrat (Figure 5). Le pH du filtrat récolté a ensuite été ajusté entre 7 et 8 à l'aide d'une solution de NaOH 1M. Cette remontée de pH a permis de préparer les prélèvements à la lecture OPA qui devait être réalisée à un pH autour de 9.

2-3.2 Dosage des peptides dans le surnageant en spectroscopie UV

2-3.2.1 Principe de la méthode

La spectrométrie UV consiste à mesurer l'absorption d'un rayonnement sur une plage de longueur d'onde de 200 à 400 nm. Un échantillon liquide (limpide de préférence) dans une cuve en quartz est placé dans le passage entre la source de lumière optique et un détecteur. L'échantillon reçoit un rayonnement d'une certaine intensité, absorbe une partie et diffuse l'autre partie. La concentration d'un échantillon peut être déterminée à partir de la quantité de rayonnement absorbée à une longueur d'onde donnée. Dans notre cas, la longueur d'onde est de 280 nm. L'absorption de la lumière à cette longueur d'onde est spécifique des protéines et plus précisément, des AA aromatiques.

2-3.2.2 Conditions opératoires

- Préparation des solutions pour la droite d'étalonnage et la mesure d'absorbance

Notre étude se fait sur un prélèvement contenant un mélange de protéines, de salive et de pepsine. Afin d'avoir une gamme d'étalonnage proche de notre prélèvement, une solution a été réalisée à partir d'une digestion totale de 1 g de fromage par 0,7 mL d'alcalase (une protéase) à pH 8 en présence de 2 mL de salive humaine et de 17 mL de SGF (EAS). L'alcalase a été sélectionnée pour réaliser la protéolyse du fromage, car d'après l'étude de Meinschmidt *et al.*¹³, elle conduirait à un DH plus élevé que la pepsine. La digestion s'est effectuée dans un bain-marie à 50°C sous agitation jusqu'à la disparition totale à l'œil nu de particules de fromage (soit environ 10h). Néanmoins, la solution d'EAS a été centrifugée pendant 10 min à 20°C à 5000g pour vérifier qu'il n'y avait plus de particules solides restantes.

Tableau III : Facteurs de dilution appliqués lors de la lecture à 275 nm en fonction des prélèvements

Temps du prélèvement (min)	Digestion avec pepsine			Digestion sans pepsine		
	Facteur de dilution	Prélèvement (µL)	Solution tampon (µL)	Facteur de dilution	Prélèvement (µL)	Solution tampon (µL)
0	50	20	980	20	50	950
15				10	100	900
30	40	25	975			
45	25	40	960			
60						
75	20	50	950			
90						
105	10	100	900			
120	8	125	875			

Tableau IV : Récapitulatif de la composition des différentes solutions préparées

		Solutions						Réactif
		TBS 20mM	SDS 20 %	Diluante	Méthionine 20mM	OPA 10mg/mL	DTT 1M	OPA
Solide (poudre)	TBS	3,8137g			-			
	SDS		20g			-		
	Méthionine				29,8g	-		
	OPA	-				15mg	-	-
	DTT						61,7mg	
Liquide	Ethanol					1,5mL		
	NaOH 1M	Ajusté à pH 9,5			-			
	Solution OPA 10mg/mL							1,25mL
	Solution DTT 1M							0,350mL
	Solution SDS 20 %			2,5mL				1,25mL
	Solution TBS 20mM			QSP 100mL				QSP50mL
	Eau	QSP 500mL	QSP 100mL		QSP10mL		0,4mL	-

- Réalisation de la mesure d'absorbance à 275 nm

La quantité de matière protéique libérée dans le surnageant a été évaluée par mesure de l'absorbance en UV. Lors de l'élaboration de spectres sur les premiers prélèvements mesurés, nous avons remarqué que le maximum d'absorbance se situait à 275 nm plutôt qu'à 280 nm. Donc, toutes les mesures ont été réalisées à une longueur d'onde de 275 nm.

Les dilutions effectuées, avec de la solution tampon, ont été adaptées à chaque prélèvement. En général, les prélèvements en fin de digestion ont été dilués deux fois plus que ceux en milieu de digestion et cinq fois plus que ceux en début de digestion (Tableau III).

Le spectrophotomètre (UVmc², Safas monaco) utilisé faisait une lecture avec un double faisceau, symétrique et simultané. Cela signifie que lors de la lecture, il y avait deux cuves qui étaient lues en même temps : une cuve avec du tampon (le blanc) et une autre cuve avec le prélèvement dilué.

- Calculs réalisés à partir de la mesure d'absorbance à 275 nm

A partir de la mesure d'absorbance des prélèvements et de la courbe d'étalonnage, il est possible de calculer le coefficient d'extinction spécifique ($\epsilon_{275 \text{ nm}}$) des protéines de notre fromage en se basant sur la formule de Beer-Lambert :

(4)	$Abs = \epsilon \times C \times l$	ϵ : coefficient d'extinction spécifique ($\text{g}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)
		Abs : Absorbance calculée pour une concentration donnée
		C : concentration (g/L)
		l : trajet optique (cm)

Le trajet optique était de 1 cm. Ainsi, le ϵ des peptides de notre fromage est d'environ $1,14 \text{ g}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Figure 6) ce qui est cohérent avec la littérature qui donne un epsilon d'environ $1 \text{ g}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Enfin, il a été possible de calculer la quantité de peptides présente dans le prélèvement et ainsi connaître la quantité de peptides qui était présente dans le surnageant lors du prélèvement à l'aide de la formule suivante et en tenant compte des facteurs de dilution :

(5)	$m_{\text{pep}} = \frac{Abs_{\text{prév}}}{\epsilon_{275 \text{ nm}} \times l} \times V_{\text{bécher}}$	m_{pep} : masse de peptide (g)
		$Abs_{\text{prév}}$: Absorbance du prélèvement
		$\epsilon_{275 \text{ nm}}$: coefficient d'extinction spécifique ($\text{g}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)
		l : trajet optique (cm)
		$V_{\text{bécher}}$: volume du bécher (L)

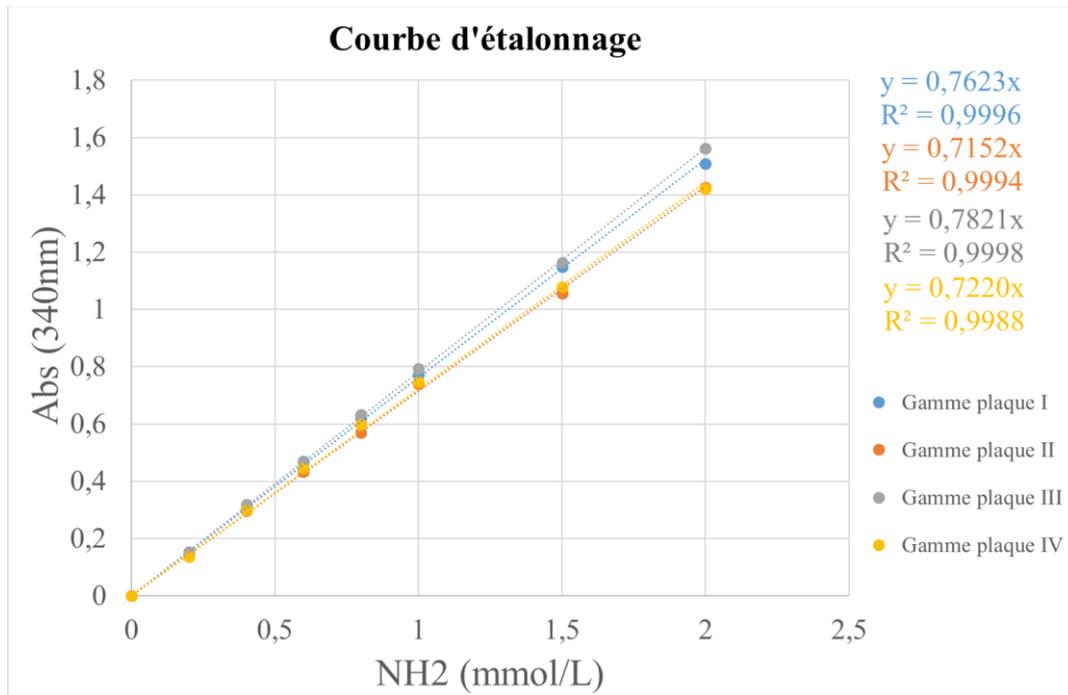


Figure 7 : Courbe d'étalonnage obtenue à partir de la solution de méthionine par lecture à 340 nm par la méthode OPA

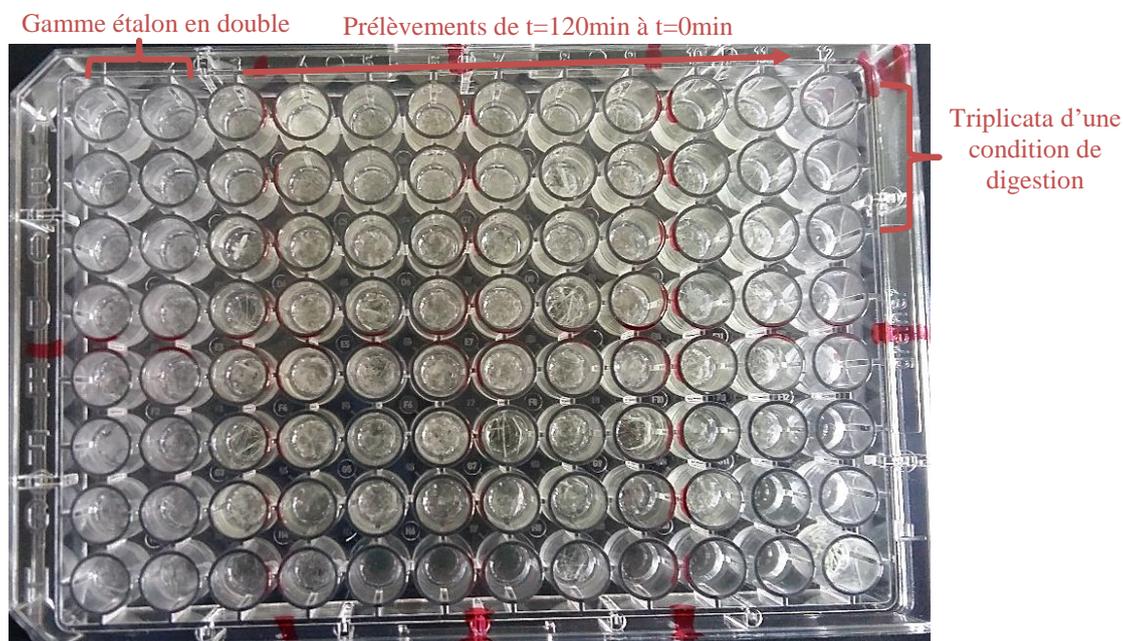


Figure 8 : Exemple d'une microplaque de lecture en OPA

2-3.3 Dosage des amines libres dans le surnageant à l'aide de la méthode OPA

2-3.3.1 Principe de la méthode

La méthode de l'Ortho-phthalaldéhyde (OPA) est une technique colorimétrique qui permet de quantifier les liaisons peptidiques hydrolysées, en dosant les groupements aminés libres d'une solution de protéines. Ces groupements réagissent avec l'OPA pour donner un complexe qui absorbe à 340 nm. Elle permet aussi de suivre les NH_2 libérés au cours du temps et de calculer un DH.

2-3.3.2 Conditions opératoires

- Préparation des solutions pour la droite d'étalonnage et la mesure en OPA

La méthode OPA utilisée se base sur les articles de Church *et al.*¹⁴ et Nielsen *et al.*¹⁵ Plusieurs solutions doivent être préparées en amont de la lecture (Tableau IV). Pour l'élaboration de la droite d'étalonnage, une gamme étalon a été réalisée à partir d'une solution de méthionine à 20 mM diluée dans de la solution diluante (Tableau IV et Figure 7).

Le réactif OPA est une solution qui ne se conserve pas longtemps (48h) et doit être protégée de la lumière. Ce réactif est préparé à partir de solutions d'OPA, DTT, SDS et TBS (Tableau IV). Le DTT permet de réduire les ponts disulfures des protéines et des peptides pour les stabiliser.

- Réalisation de la mesure en OPA

La lecture a été faite dans des microplaques de 96 puits adaptées à la lecture en UV à 340 nm après une incubation à 37°C et une agitation de la microplaque pendant 10 min par le spectrophotomètre (Multiskan G0, Thermo scientific).

Pour limiter les biais, les dilutions des prélèvements ont été réalisées avec une pipette multicanaux. Les facteurs de dilution des prélèvements à employer (gamme : 20 à 40) ont été déterminés à partir de tests préliminaires.

Pour la lecture, 50 μL de prélèvement dilué à analyser (ou 50 μL de solution étalon) et 100 μL de réactif OPA ont été insérés dans les puits des microplaques à l'aide d'une pipette multicanaux. Tous les prélèvements ont été analysés en trois exemplaires et pour chaque plaque utilisée, une gamme étalon a été réalisée en double (Figure 8).

- Calculs réalisés à partir de la mesure OPA

Contrairement à la lecture en cuve, la lecture en microplaque n'enlève pas directement le blanc, qui se constitue de la solution diluante et du réactif OPA.

Comme pour la mesure à 275 nm, il est possible de calculer le coefficient d'extinction spécifique (ϵ_{OPA}) des protéines de notre fromage en se basant sur la mesure d'absorbance des prélèvements, de la courbe d'étalonnage (Figure 7) et de la formule de Beer-Lambert (équation (4)). Cette fois, la concentration est en mmol/L, ce qui donne une ϵ en $\text{mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$

Pour déterminer la quantité de NH_2 présent dans le surnageant lors du prélèvement, la formule suivante a été utilisée en tenant compte des facteurs de dilutions :

$$(6) \quad n_{\text{NH}_2} = \frac{\text{Abs}_{\text{prév}} - \text{Abs}_{\text{b}}}{\epsilon_{\text{OPA}} * l} \times (V_{\text{bécher}})$$

n_{NH_2} : quantité de NH_2 (mmol)
 $\text{Abs}_{\text{prév}}$: Absorbance du prélèvement
 Abs_{b} : Absorbance du blanc
 ϵ_{OPA} : coefficient d'extinction spécifique ($\text{mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)
 l : trajet optique (cm)
 $V_{\text{bécher}}$: volume du bécher (L)

En combinant les résultats obtenus sur la masse de peptides dans le surnageant à l'aide de la lecture à 275 nm et ceux obtenus sur la quantité de NH_2 dans le surnageant par la lecture OPA, il a été possible d'étudier l'évolution de la quantité de NH_2 par masse de peptides présents dans le surnageant en fonction du temps.

Enfin, à l'aide des masses de peptides (estimées par absorbance à 275 nm) et des quantités de NH_2 libérées lors de l'hydrolyse (estimées par la méthode OPA), il est possible d'en déduire un DH à partir de la formule :

$$(7) \quad \text{DH} (\%) = \left(\frac{\left(X_{\text{NH}_2/\text{pep}} \times M_{\text{caséines}} \right) - \left(X_{\text{NH}_2/\text{caséines}} \times M_{\text{caséines}} \right)}{N_{\text{caséines}}} \right) \times 100 \times \left(\frac{m_{\text{pep}}}{m_{\text{prot}}} \right)$$

$X_{\text{NH}_2/\text{pep}}$: quantité moyenne de NH_2 par masse de peptides (mol NH_2/g) ;
 $M_{\text{caséines}}$: masse molaire moyenne des caséines (g/mol) ;
 $X_{\text{NH}_2/\text{caséines}}$: quantité moyenne de NH_2 par masse de caséines (mol NH_2/g) ;
 $N_{\text{caséines}}$: nombre moyen d'AA par caséines (mol NH_2/g);
 m_{pep} : masse de peptide (g) ; m_{prot} : masse de protéines du fromage (g)

Les données sur les caséines (0,5 mmol NH_2/g caséine¹⁶, 196 acides aminés moyens composant les caséines et une masse molaire moyenne des caséines de 22 975 g/mol¹⁷) ont été utilisées pour calculer le DH à chaque temps et pour chaque condition.

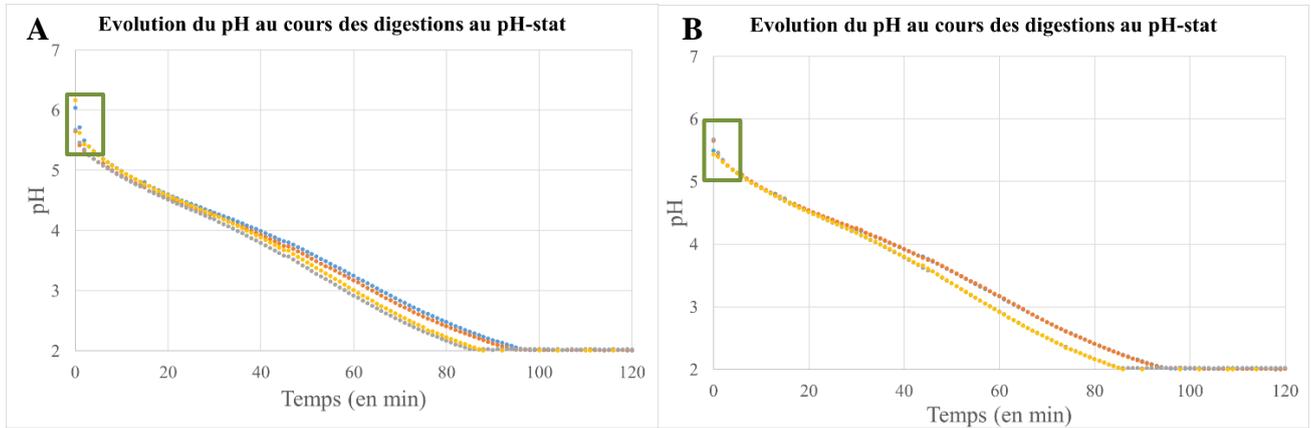


Figure 9 : Evolution du pH en fonction du temps au cours des digestions, obtenu à partir des données du pH-stat.

● 100% salive + pepsine, ● 0% salive + pepsine, ● 0% salive sans pepsine, ● 100% salive + pepsine
 La figure A montre les données brutes et le figure B montre les données avec un décalage de 2 minutes pour les digestions avec salive.

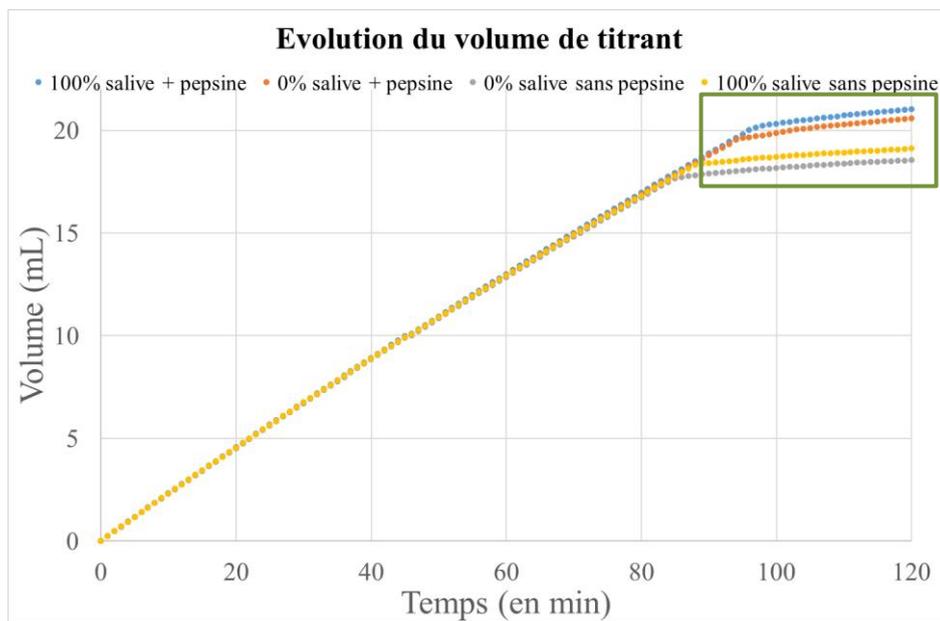


Figure 10 : Evolution du volume de titrant au cours des digestions, obtenu à partir des données du pH-stat

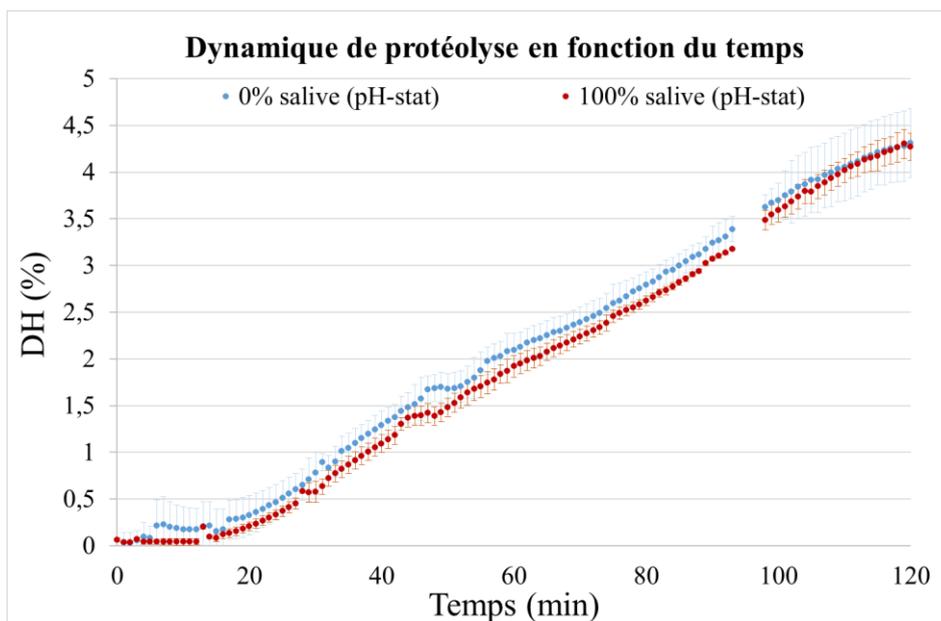


Figure 11 : Evolution du DH en fonction du temps pour les 4 conditions de digestion réalisées au pH-stat

III. Résultats

3-1 Evolution du degré d'hydrolyse d'après les données du pH-stat

- Evolution du pH en fonction du temps

D'après la Figure 9 A, nous pouvons remarquer que les digestions contenant de la salive débutent avec un pH plus élevé que celles qui n'ont pas de salive. Le pH initial d'environ 5.7 observé pour les expériences sans salive est atteint dans les échantillons avec salive après environ 2 minutes.

En retirant 2 minutes au début de la digestion contenant de la salive, les pH de départ des digestions sont proches et nous pouvons voir que les courbes avec et sans pepsine se superposent quasiment parfaitement (Figure 9 B).

De plus, nous pouvons voir que les essais sans pepsine atteignent le pH 2 plus rapidement que les digestions avec pepsine, ce qui était attendu. Comme précédemment expliqué, l'hydrolyse des liaisons peptidique à pH acide induit une consommation de protons du milieu réactionnel au travers des équilibres acide/base des amines et acides carboxyliques néoformés.

- Evolution du volume de titrant ajouté en fonction du temps

Le décalage de pH observé précédemment pour les essais avec et sans salive se répercute sur le volume de titrant ajouté au cours de la digestion (Figure 10). En effet, le volume final ajouté est supérieur dans les digestions avec salive. Par exemple, dans le cas où la digestion contient de la pepsine, la courbe bleue qui représente le suivi d'une digestion contenant de la salive est supérieure à la courbe orange qui représente le suivi d'une digestion sans salive. Le volume de titrant ajouté est identique dans les quatre conditions de digestion jusqu'à l'approche de pH 2 car le débit de pompe du pH-stat a été fixé à 0,28 mL/min dans tous les essais.

- Evolution du degré d'hydrolyse en fonction du temps

Comme nous le montre la Figure 11, le DH commence à augmenter à partir de 15 minutes de digestion, ce qui correspond à un pH d'environ 4,5 (Figure 9). Au final, le DH dans les échantillons avec ou sans salive est équivalent (4,31 % vs 4.27%).

3-2 Libération des peptides dans le surnageant

- Evolution de la concentration de peptides dans le surnageant en fonction du temps

A partir de la Figure 12 A, nous pouvons observer que la concentration de peptides augmente régulièrement dans le surnageant au cours du temps, pour les digestions avec pepsine, pour atteindre environ 24 g/L en moyenne.

Quant à la concentration de peptides dans le surnageant pour les digestions sans pepsine, elle semble être constante au cours du temps avec une concentration moyenne d'environ 5 g/L. De plus, nous pouvons remarquer que la concentration de peptides dans le surnageant est comparable en présence et en absence de salive.

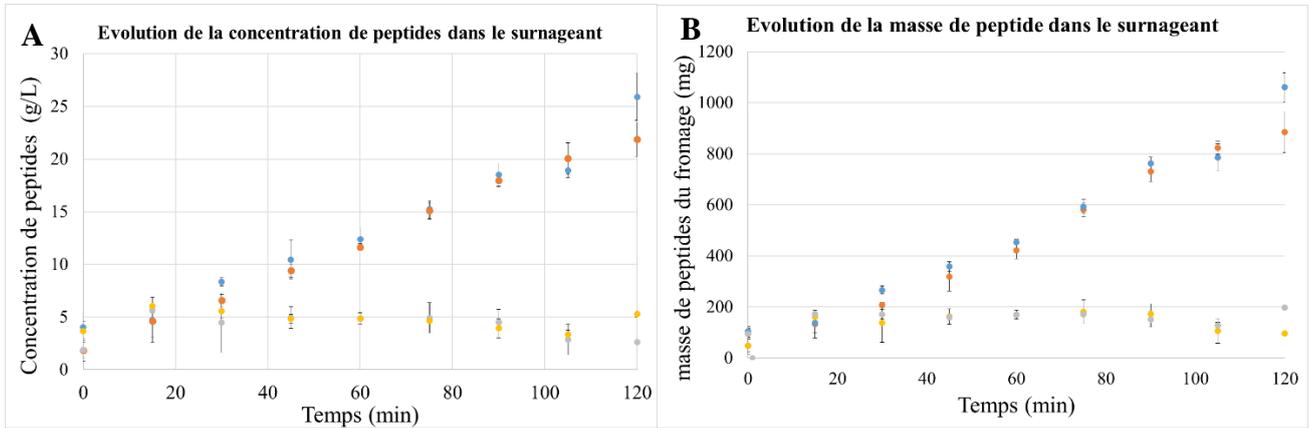


Figure 12 : Evolution de la concentration de peptides (A) et de la masse de peptides (B) libérés dans le surnageant au cours de la digestion, calculées à partir des données de la lecture à 275 nm.

● 100% salive + pepsine, ● 0% salive + pepsine, ● 0% salive sans pepsine, ● 100% salive + pepsine

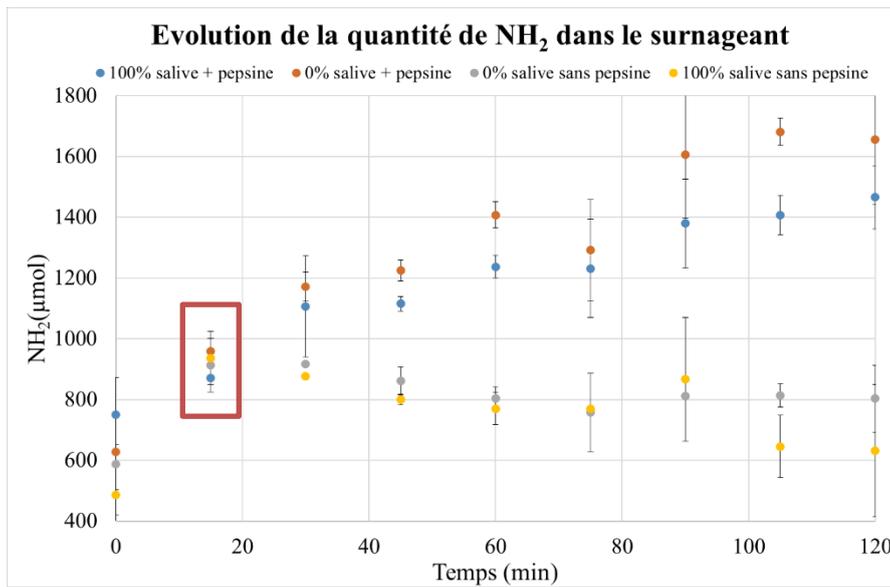


Figure 13 : Evolution de la quantité de NH₂ présent dans le surnageant en fonction du temps, calculée à partir des données de la lecture en OPA

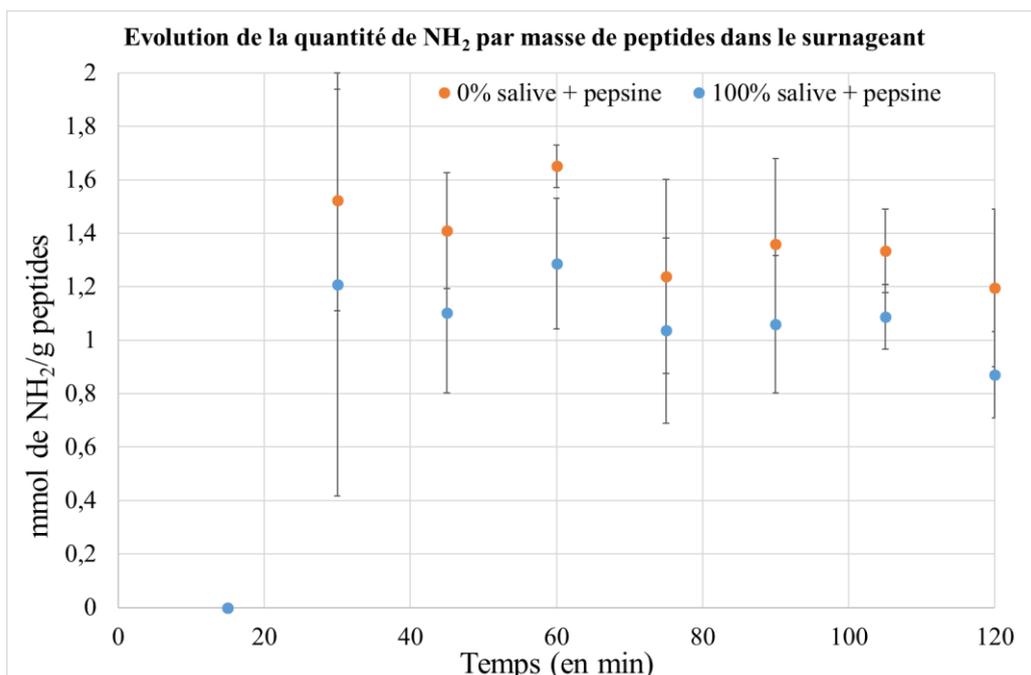


Figure 14 : Evolution de la quantité de NH₂ par masse de peptides présent dans le surnageant en fonction du temps en considérant le point de départ à 15 min

- Evolution de la masse de peptides dans le surnageant en fonction du temps

Pour la masse de peptides libérée dans le surnageant au cours de la digestion, nous observons la même tendance d'évolution que pour la concentration dans les quatre conditions (Figure 12 B). La masse de protéines totale qu'il y avait dans une fraction de 8 g de fromage était d'environ 2,24 g. Pour les digestions contenant de la pepsine, la masse finale moyenne de peptides libérés dans le surnageant est d'environ 972,5 mg soit 43,42 % de la masse de protéines totale. Celle des digestions sans pepsines stagne autour de 160 mg ce qui correspond à 7,14 % de la masse de protéines totale.

3-3 Evolution de la quantité de NH_2 dans le surnageant

- Evolution de la quantité de NH_2 dans le surnageant en fonction du temps

D'après la Figure 13, nous pouvons observer que la quantité de NH_2 dans le surnageant augmente au cours de la digestion, pour les digestions en présence de pepsine, avec des valeurs légèrement supérieures pour la condition sans salive. Pour les digestions sans pepsine, la quantité de NH_2 dans le surnageant semble constante tout au long de la digestion.

Il faut noter que la quantité de NH_2 est importante dans le surnageant dès le début des expériences, démontrant qu'une quantité non négligeable de matière azotée se libère dans le milieu sans (ou avant) l'hydrolyse des protéines par la pepsine. Nous pouvons aussi remarquer qu'à $t=15$ min, les 4 conditions donnent des quantités de NH_2 comparables avec des écarts-types qui sont faibles, et les essais sans pepsine restent environ stables ensuite. Pour estimer l'augmentation de la quantité de NH_2 dans le surnageant attribuable à l'hydrolyse des protéines nous avons donc décidé de soustraire la mesure à $t=15$ min aux données ultérieures.

- Evolution de la quantité de NH_2 par masse de peptides présents dans le surnageant

En combinant les données obtenues pour la masse de peptides et la quantité de NH_2 dans le surnageant, nous pouvons voir sur la Figure 14 que la quantité de NH_2 libérée par masse de peptides est relativement stable en présence de pepsine. Pour la digestion sans salive, elle varie autour de 1,4 mmol de NH_2/g peptides et pour la digestion avec salive, elle est autour des 1,1 mmol de NH_2/g peptides.

3-4 Evolution du degré d'hydrolyse d'après les résultats d'OPA et d'absorbance à 275 nm

D'après la Figure 15, nous pouvons voir que le DH augmente au cours de la digestion. Les digestions sans salive arrivent à un DH d'environ 4,10 % alors que le DH des digestions avec salive est d'environ 3,30 %.

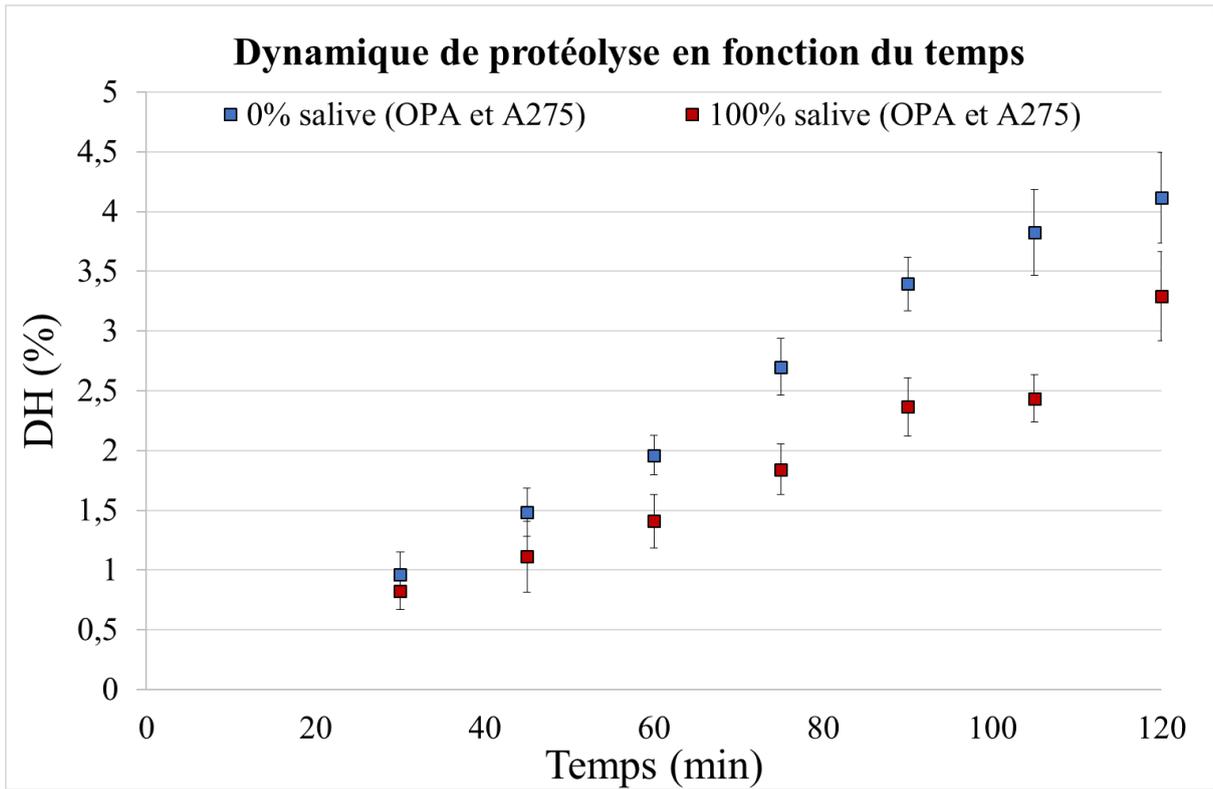


Figure 15 : Evolution du DH en fonction du temps pour les 4 conditions de digestion, calculé à partir des données des lectures spectrométriques

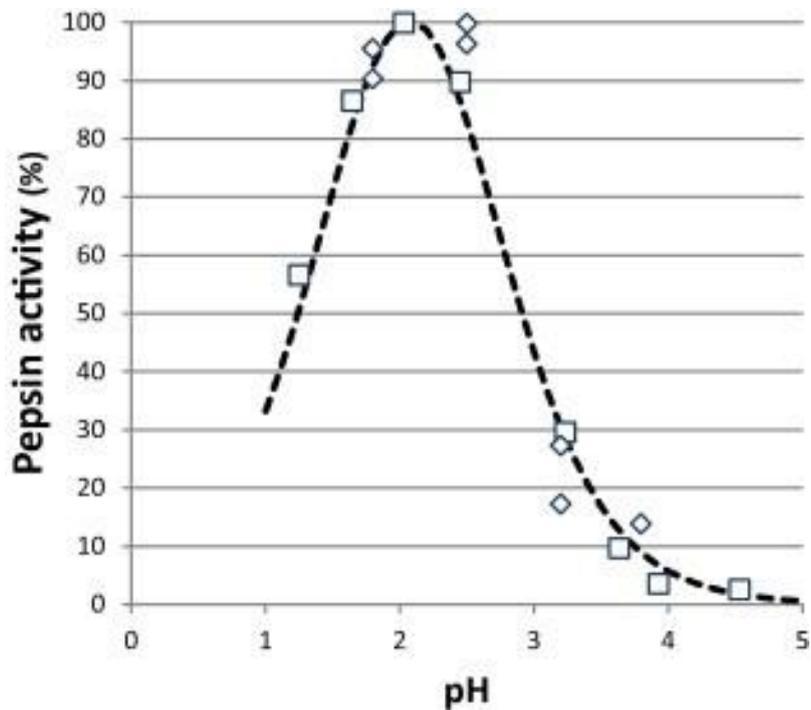


Figure 16 : Activité de la pepsine porcine en fonction du pH selon Kondjoyan et al¹⁸

IV. Discussion

- Effet de la salive

Les méthodes mises en œuvre dans cette étude avaient pour but d'étudier si la salive avait des effets sur la protéolyse en phase gastrique.

Comme l'ont montré les Figure 9, en présence de salive le pH de départ se situait entre 6 et 6,1 alors que sans salive, il était entre 5,6 et 5,7. Cette différence de pH entraîne un surplus de volume de titrant, qui est visible sur la Figure 10. Globalement, les digestions avec salive semblent simplement être décalées d'environ 2 min comparées aux digestions sans salive.

Un pH de départ plus élevé en présence de salive peut s'expliquer par l'effet tampon de la salive. Cet effet est dû à ces composants : hydrogénocarbonate, phosphate, protéines. L'hydrogénocarbonate joue un rôle important dans la neutralisation des acides⁵.

L'effet tampon de la salive s'additionne à celle du fromage. Avec un pH se situant autour de 5,6 (proche du pH de départ des digestions sans salive), l'emmental possède un effet tampon très fort lors de la digestion gastrique dû à sa forte teneur en protéines. Toutefois, le fromage est sous forme de particules alors que la salive se dilue dans le surnageant. Il est donc logique que la salive ait un impact sur les pH mesurés en début de digestion. Au cours de la titration, par contre, c'est bien l'effet tampon du fromage, qui explique la décroissance du pH. Cet effet tampon est notamment visible lors du maintien du pH à 2 en fin de digestion : le volume de titrant continue légèrement d'augmenter même en l'absence de pepsine à cause de la diffusion des protons du surnageant vers les cœurs des particules de fromage (Figure 10).

Au niveau de la protéolyse, nous ne pouvons pas affirmer que la salive ait un effet direct. Comme nous avons pu le voir sur la Figure 12, la concentration en peptides présents dans le surnageant au cours de la digestion varie essentiellement en fonction de la présence ou non de pepsine. Les courbes avec pepsine sont très proches et se superposent à certains moments.

En étudiant la quantité de peptides dans le surnageant (Figure 12 B) et la quantité de NH_2 dans le surnageant (Figure 13) nous avons pu remarquer qu'à 15 min, les 4 conditions avaient une quantité de peptides ou de NH_2 qui était très proche et qu'à partir de 30 min, les digestions avec et sans pepsine commençaient à se distancer. Ces résultats coïncident avec ceux observés sur la courbe de DH obtenu au pH-stat (Figure 11) où la courbe commence à augmenter à partir de 15 min. En regardant la courbe de pH (Figure 9), nous avons pu relever qu'à $t=15$ min le pH se situait aux alentours de 4,7 et qu'à $t=30$ min, il était autour de 4,2. En se basant sur la Figure 16, nous pouvons faire le lien et dire que la pepsine débute la protéolyse du fromage à partir de 15 min de digestion, car c'est vers les pH 4,3 - 4,4 que l'activité protéolytique de la pepsine commence.

Ainsi, il est possible de faire l'hypothèse que la quantité de NH_2 présente dans le surnageant avant $t=15$ min, provient en partie des molécules (protéines, autre matière azotée) présentes au sein des particules de fromages qui sont relarguées dans le surnageant lors de l'agitation.

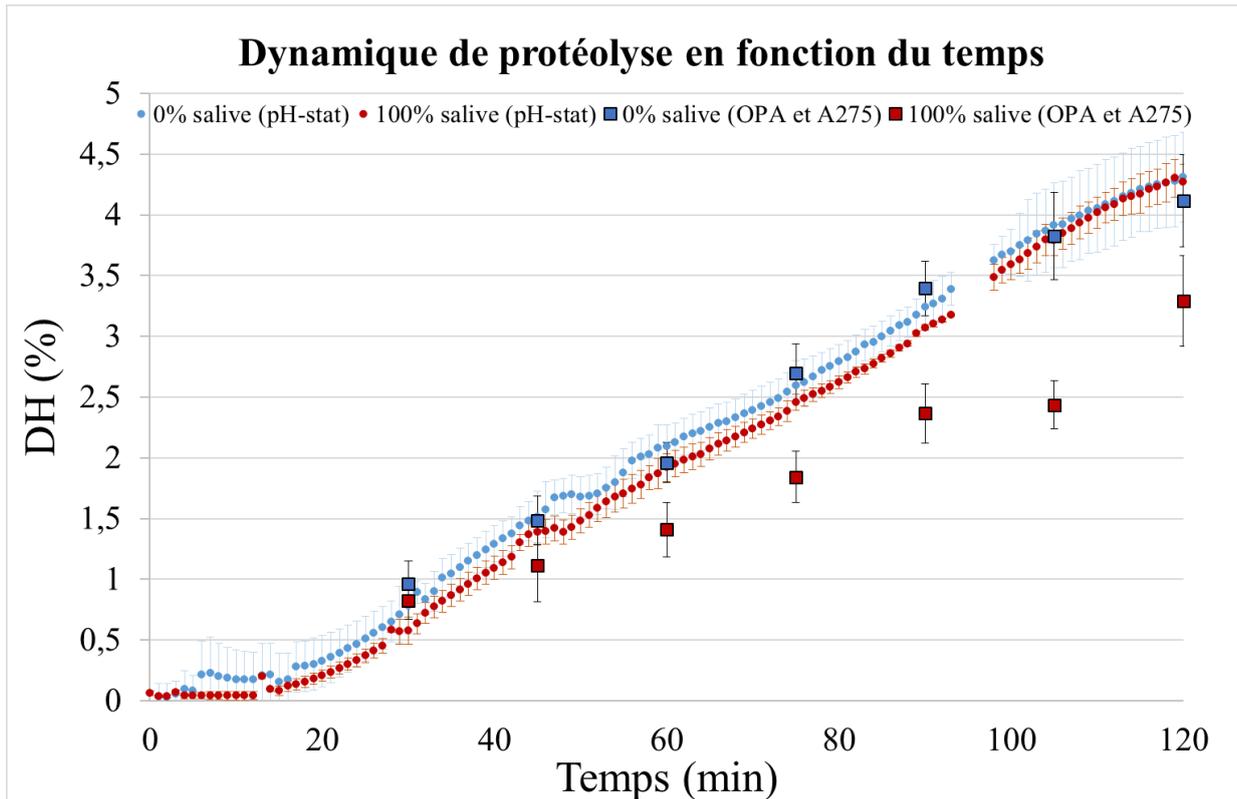


Figure 17 : Comparaison des résultats calculés par deux méthodes (pH-stat ou dosages spectrométriques)

De plus, la viscosité de la salive pourrait aussi jouer sur la convection lors de l'agitation du contenu du bécher lors de l'expérimentation. Un mélange plus visqueux réduit la probabilité de rencontre enzyme/substrat, ce qui pourrait diminuer le contact des protéines avec la pepsine et donc réduire la protéolyse.

L'étude du DH confirme les observations précédentes. Le DH a été calculé à l'aide de deux méthodes. La première méthode se base sur les données obtenues au pH-stat et la deuxième méthode est issue des analyses spectroscopiques (275 nm et OPA) réalisées sur les prélèvements de surnageant effectués lors des digestions *in vitro* semi-dynamiques au pH-stat.

A l'aide des données du pH-stat, des courbes d'environ 120 points ont été obtenues (Figure 11). Elles ont permis de mettre en évidence que la protéolyse commence vers les 15 min de digestion (moment où la courbe commence sa montée) pour les digestions en présence de salive avec un décalage d'environ 2 min par rapport aux digestions en absence de salive. Néanmoins, les DH finaux obtenus sont très similaires, 4,27 % en présence de salive (100 % salive) et 4,31 % en absence de salive (0 % salive), ce qui fait une différence de moins de 1 % (0.04/4.31) entre les deux conditions. De plus, l'écart entre les deux courbes tout au long de la digestion est faible et semble s'estomper en fin d'expérience. Quoi qu'il en soit, s'il y a un effet minime de la salive, ce dernier est cohérent avec l'absence d'inhibiteur de protéases aspartiques.

A partir des analyses spectroscopiques, les courbes d'évolution du DH ne se composent que de 7 points qui représentent les prélèvements effectués tous les 15 min (Figure 15). D'après les résultats qui ont été observés sur la Figure 12 et la Figure 13, le point de départ de la courbe de DH a été défini à $t=15$ min (soit un DH de 0 % à 15 min) d'où le fait que les données de DH ne commencent qu'à partir de $t=30$ min. Comme pour les données acquises via le pH-stat, les digestions en absence de salive ont un DH supérieur aux digestions en présence de salive. L'écart entre les deux courbes est plus important, mais comme observé pour les courbes au pH-stat, au point final les courbes se rapprochent. Les DH obtenus au point final sont de 3,30 % en présence de salive et 4,11 % en absence de salive ce qui fait une différence de 24 % (0,81/3.30). Bien que le décalage entre les deux courbes soit plus grand, cela ne nous permet pas de justifier que la salive ait un effet considérable sur la protéolyse lors de la digestion gastrique.

Il n'est toutefois pas impossible que la salive ait un petit effet sur la quantité de NH_2 libérée dans le surnageant au cours de la digestion. D'après la Figure 13, les digestions sans salive semblent être associées à une quantité légèrement supérieure de NH_2 . De même, les DH mesurés par 2 approches différentes montrent que le DH des digestions sans salive est légèrement supérieur à celui des digestions avec salive. Néanmoins, d'autres données seraient nécessaires pour valider ou infirmer cette observation.

- Comparaison des deux méthodes de détermination du DH

La Figure 17 résume l'évolution des DH calculés à l'aide des deux méthodes. Nous pouvons observer que dans les deux cas, les courbes possèdent la même dynamique d'évolution. Les données de DH en valeurs absolues sont cohérentes entre elles et avec la littérature. En général, la pepsine hydrolyse entre 1 à 10 % des protéines ingérées au cours de la digestion gastrique¹³ et nous trouvons un DH moyen de 4 % pour du fromage.

Les valeurs obtenues à partir des analyses spectroscopiques sont associées à plus d'incertitude que celles obtenues à partir des données du pH-stat. L'utilisation de deux mesures (que l'on divise) pour arriver à un DH provoque forcément plus d'incertitude qu'une seule mesure. Cette remarque est justifiée par la taille des écarts-types.

Les mesures à 275 nm ont été faites individuellement en utilisant la même cuve quartz. Ce matériel est dédié aux mesures physiques précises ce qui apporte une bonne précision. Les mesures en OPA ont été effectuées dans plusieurs microplaques. Ce matériel permet des analyses plus rapides, mais moins précises, ce qui induit une variabilité des résultats par le protocole. De plus, la mesure à 275 nm est une mesure directe, contrairement à l'OPA qui est une mesure indirecte, car elle fait suite à une réaction chimique.

De plus, lors des calculs de DH, nous avons implicitement fait l'hypothèse que tout ce qui n'était pas dans le surnageant avait un DH de 0 (pas d'hydrolyse) en se basant sur l'hypothèse que les peptides une fois hydrolysés se retrouvent en suspension dans le surnageant, ce qui n'est probablement pas totalement vrai.

Tout cela peut expliquer des DH calculés plus faible et une différence plus importante entre les deux courbes (0 % salive et 100 % salive) pour les mesures en spectroscopies comparés à ceux calculés à partir des données du pH-stat.

La méthode du pH-stat pour la détermination du DH s'est avérée rapide, simple et fiable. Le pH-stat permet de réaliser des digestions reproductibles avec peu de variabilité. Les données obtenues avec le logiciel *Tiamo* sont simples à exporter et à utiliser. Les valeurs enregistrées toutes les secondes permettent d'avoir un jeu de données très bien résolu temporellement. Il n'y a pas besoin de réaliser d'analyses supplémentaires. Par contre, le traitement des données nécessaire pour remonter au DH en fonction du temps n'est pas simple et nécessite l'emploi d'un logiciel de programmation.

Les analyses spectroscopiques sont quant à elles plus longues, plus techniques et engendrent plus d'incertitude. La mesure à 275 nm ne permet de mesurer que l'absorbance caractéristique des AA aromatiques. Pour les mesures en OPA, la préparation des différentes solutions ainsi que la succession des dilutions à effectuer, augmente considérablement le risque d'erreurs. Les valeurs obtenues varient en fonction du pH de lecture, et certains AA ne réagissent peu ou pas avec l'OPA (cystéine et proline).

De plus, les calculs réalisés à partir des données obtenues sont plus approximatifs, car nous nous sommes basés sur les données moyennes des caséines présentes dans le lait de vache, or nous ne connaissons pas précisément la répartition des caséines dans notre fromage ni celle des autres protéines (ex : protéines solubles). Néanmoins, les analyses spectroscopiques permettent de fournir des données sans passer par de longues étapes d'incubation comme par exemple la méthode de Kjeldahl et permettent de faire un suivi d'hydrolyse des protéines. Les remarques énoncées pour les deux méthodes rejoignent celles décrites par Spellman *et al.*¹⁹

Tout ce travail va maintenant pouvoir être approfondi avec l'étude d'effets « indirects » de la salive sur d'autres composants d'un repas comme par exemple sur des tanins ou encore sur du pain. La très grande affinité de certaines protéines salivaires (PRPs) pour les polyphénols / tanins⁷ pourrait augmenter l'effet de ces molécules sur la digestion gastrique et notamment sur la pepsine.

De plus, lors de mon étude, nous n'avons étudié que l'effet de la salive sur la protéolyse lors de la digestion gastrique. Or, la salive peut aussi avoir un effet sur l'amylolyse et la lipolyse lors de la digestion gastrique.

En effet, l'acidification progressive du bol alimentaire lors de la digestion gastrique permet à l'amylase salivaire de rester active dans l'estomac jusqu'à son inactivation à pH acide, entre 3 et 3,8, ce qui serait intéressant pour une étude sur de la digestion de l'amidon lors de la phase gastrique. Quant à la lipase gastrique, elle est très stable en milieu acide et est active à des pH compris entre 3 et 6, ce qui serait intéressant pour une étude sur l'effet de la salive sur la lipolyse lors de la digestion gastrique, notamment sur du fromage.

Conclusion

J'ai effectué mon stage de fin d'études en tant que chercheuse stagiaire au sein de l'UMR STLO de l'INRAE de Rennes. Lors de ce stage de 6 mois, j'ai pu mettre en pratique mes connaissances théoriques acquises durant mes formations en école d'ingénieur et en master sur la digestion, la nutrition et l'analyse de protéines. Mon sujet de stage a porté sur les effets de la salive sur la protéolyse par la pepsine qui a lieu lors d'une digestion gastrique. Cette étude a été faite sur du fromage à l'aide d'une méthode de digestion *in vitro* semi-dynamique.

Une des fonctions essentielles de l'estomac est de stocker les aliments ingérés et de réguler le flux délivré à l'intestin, gouvernant ainsi l'ensemble de la digestion. L'estomac permet une prédigestion des aliments par l'intermédiaire de ses contractions et de différentes réactions d'hydrolyse enzymatique. C'est donc une étape clé de la digestion. Les sécrétions de l'estomac, comme la sécrétion d'HCl pour acidifier le contenu ou encore les sécrétions d'enzymes comme la pepsine, permettent la digestion du bol alimentaire arrivant de la bouche. L'arrivée de la salive avec le bol alimentaire dans l'estomac peut interférer lors de la digestion gastrique.

Des digestions *in vitro* semi-dynamique ont été réalisées à l'aide d'un pH-stat. Deux méthodes d'analyse ont été utilisées pour l'exploitation des données : l'étude directe des données enregistrées au pH-stat et des analyses spectroscopiques sur des prélèvements de surnageant. Les résultats obtenus à partir de mes expérimentations montrent que la salive pourrait avoir un effet minime indirect sur la protéolyse au cours de la digestion gastrique. En effet, elle n'agit pas directement sur la protéolyse, en bloquant la pepsine par exemple, mais elle semblerait ralentir son action en agissant sur l'accessibilité des protéines (viscosité du milieu).

Nous avons pu voir sur la Figure 17 qu'en présence de salive, le DH des protéines était légèrement inférieur, mais cet écart n'est pas significatif pour affirmer un effet direct de la salive sur la protéolyse. De plus, les résultats obtenus au pH-stat, tendraient à dire qu'il n'y a pas d'effet de la salive alors que les résultats obtenus par les analyses spectroscopiques laisseraient à penser à un effet minime. Néanmoins, nous pouvons affirmer que les résultats obtenus sont fiables en termes d'ordre de grandeur, car ils sont cohérents avec ceux de la littérature¹³.

Mon étude était un prérequis à l'étude de la protéolyse gastrique en présence de polyphénols et de salive. Des études ont montré que les polyphénols pouvaient avoir des effets positifs sur l'activité de la pepsine. Selon une étude de Tagliazucchi *et al.*, en présence de polyphénols (catéchine, resvératrol et quercétine), la quantité de peptides libérés au cours de la digestion est plus importante qu'en présence d'eau⁶. Cependant, une autre étude avait démontré que les polyphénols du thé pouvaient diminuer de manière significative la protéolyse lors de la phase gastrique²⁰.

Les études qui vont suivre celle que j'ai réalisée devront permettre de confirmer ou infirmer ces données et d'étudier si la salive a un effet sur les polyphénols au niveau de la digestion gastrique, car il a été aussi démontré que la salive avait une forte affinité pour les tanins⁷.

Références bibliographiques

- (1) Minekus, M.; Alminger, M.; Alvito, P.; Ballance, S.; Bohn, T.; Bourlieu, C.; Carrière, F.; Boutrou, R.; Corredig, M.; Dupont, D.; Dufour, C.; Egger, L.; Golding, M.; Karakaya, S.; Kirkhus, B.; Le Feunteun, S.; Lesmes, U.; Macierzanka, A.; Mackie, A.; Marze, S.; McClements, D. J.; Ménard, O.; Recio, I.; Santos, C. N.; Singh, R. P.; Vegarud, G. E.; Wickham, M. S. J.; Weitschies, W.; Brodkorb, A. A Standardised Static *in Vitro* Digestion Method Suitable for Food – an International Consensus. *Food Funct* **2014**, *5* (6), 1113–1124. .
- (2) Malagelada, J.-R.; Go, V. L. W.; Summerskill, W. H. J. Different Gastric, Pancreatic, and Biliary Responses to Solid-Liquid or Homogenized Meals. *Dig. Dis. Sci.* **1979**, *24* (2), 101–110. .
- (3) Fujinaga, M.; Chernai, M. M.; Mosimann, S. C.; James, M. N. G.; Tarasova, N. I. Crystal Structure of Human Pepsin and Its Complex with Pepstatin. *Protein Sci.* **2008**, *4* (5), 960–972.
- (4) Pedersen, A.; Bardow, A.; Jensen, S. B.; Nauntofte, B. Saliva and Gastrointestinal Functions of Taste, Mastication, Swallowing and Digestion. *Oral Dis.* **2002**, *8* (3), 117–129.
- (5) Humphrey, S. P.; Williamson, R. T. A Review of Saliva: Normal Composition, Flow, and Function. *J. Prosthet. Dent.* **2001**, *85* (2), 162–169.
- (6) Tagliazucchi, D.; Verzelloni, E.; Conte, A. Effect of Some Phenolic Compounds and Beverages on Pepsin Activity during Simulated Gastric Digestion. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (22), 8706–8713.
- (7) Baxter, N. J.; Lilley, T. H.; Haslam, E.; Williamson, M. P. Multiple Interactions between Polyphenols and a Salivary Proline-Rich Protein Repeat Result in Complexation and Precipitation †. *Biochemistry* **1997**, *36* (18), 5566–5577.
- (8) Piper, D. W.; Fenton, B. H. PH Stability and Activity Curves of Pepsin with Special Reference to Their Clinical Importance. *Gut* **1965**, *6* (5), 506–508.
- (9) Mulet-Cabero, A.-I.; Egger, L.; Portmann, R.; Ménard, O.; Marze, S.; Minekus, M.; Le Feunteun, S.; Sarkar, A.; Grundy, M. M.-L.; Carrière, F.; Golding, M.; Dupont, D.; Recio, I.; Brodkorb, A.; Mackie, A. A Standardised Semi-Dynamic *in Vitro* Digestion Method Suitable for Food – an International Consensus. *Food Funct.* **2020**, *11* (2), 1702–1720.
- (10) Repoux, M.; Labouré, H.; Courcoux, P.; Andriot, I.; Sémon, É.; Yven, C.; Feron, G.; Guichard, E. Combined Effect of Cheese Characteristics and Food Oral Processing on *in Vivo* Aroma Release: *In Vivo* Aroma Release during Cheeses Oral Processing. *Flavour Fragr. J.* **2012**, *27* (6), 414–423.
- (11) Jalabert-Malbos, M.-L.; Mishellany-Dutour, A.; Woda, A.; Peyron, M.-A. Particle Size Distribution in the Food Bolus after Mastication of Natural Foods. *Food Qual. Prefer.* **2007**, *18* (5), 803–812.
- (12) Mat, D. J. L.; Cattenoz, T.; Souchon, I.; Michon, C.; Le Feunteun, S. Monitoring Protein Hydrolysis by Pepsin Using PH-Stat: In Vitro Gastric Digestions in Static and Dynamic PH Conditions. *Food Chem.* **2018**, *239*, 268–275.
- (13) Meinschmidt, P.; Sussmann, D.; Schweiggert-Weisz, U.; Eisner, P. Enzymatic Treatment of Soy Protein Isolates: Effects on the Potential Allergenicity, Technofunctionality, and Sensory Properties. *Food Sci. Nutr.* **2016**, *4* (1), 11–23.
- (14) Church, F. C.; Swaisgood, H. E.; Porter, D. H.; Catignani, G. L. Spectrophotometric Assay Using O-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins. *J. Dairy Sci.* **1983**, *66* (6), 1219–1227.
- (15) Nielsen, P. M.; Petersen, D.; Dambmann, C. Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *J. Food Sci.* **2001**, *66* (5), 642–646. .
- (16) Bo, L.-Y.; Pang, J.-N.; Song, C.-L.; Li, T.-J. Effect of the Plastein Reaction in Presence of Extrinsic Amino Acids on the Protective Activity of Casein Hydrolysate against Ethanol-Induced Damage in HHL-5 Cells. *Foods* **2019**, *8* (4), 112.(17) Payens, T. A. Les propriétés physico-chimiques des caséines alpha s1, bêta et kappa. *Le Lait* **1982**, *62* (617–620), 306–320.
- (18) Kondjoyan, A.; Daudin, J.-D.; Santé-Lhoutellier, V. Modelling of Pepsin Digestibility of Myofibrillar Proteins and of Variations Due to Heating. *Food Chem.* **2015**, *172*, 265–271.
- (19) Spellman, D.; McEvoy, E.; O’Cuinn, G.; FitzGerald, R. J. Proteinase and Exopeptidase Hydrolysis of Whey Protein: Comparison of the TNBS, OPA and PH Stat Methods for Quantification of Degree of Hydrolysis. *Int. Dairy J.* **2003**, *13* (6), 447–453.
- (20) Lamothe, S.; Azimy, N.; Bazinet, L.; Couillard, C.; Britten, M. Interaction of Green Tea Polyphenols with Dairy Matrices in a Simulated Gastrointestinal Environment. *Food Funct* **2014**, *5* (10), 2621–2631.