



HAL
open science

Suivis spatio-temporels des cinétiques de désintégration de particules alimentaires au cours de digestion gastrique *in vitro*

Malaz Almohbani

► **To cite this version:**

Malaz Almohbani. Suivis spatio-temporels des cinétiques de désintégration de particules alimentaires au cours de digestion gastrique *in vitro*. Alimentation et Nutrition. 2021. hal-03282550

HAL Id: hal-03282550

<https://hal.inrae.fr/hal-03282550>

Submitted on 9 Jul 2021

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

MASTER BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Rapport de stage M2

ALMOHBANI Malaz

Suivis spatio-temporels des cinétiques de
désintégration de particules alimentaires au
cours de digestion gastrique *in vitro*

2020-2021

Responsables de Stage : Juliane Floury et Steven Le
Feunteun

Laboratoire d'accueil : UMR STLO (INRAE - Institut Agro)



Remerciements

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

Ensuite je remercie Monsieur Didier DUPONT, responsable de l'équipe Bioactivité et Nutrition pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, pour sa disponibilité et ses conseils

Mes remerciements se portent particulièrement à mes responsables de stage, Juliane FLOURY enseignant chercheur, pour sa confiance et les missions valorisantes qui m'a attribué durant le stage et Monsieur Steven LE FEUNTEUN chargé de recherche au sein de l'UMR STLO, pour sa patience, pour toutes les connaissances qu'il m'a apportées, pour ses conseils toujours pertinents pour l'avancée de mes expérimentations

Je remercie vivement Monsieur Luca LANOTTE chargé de recherche au sein de l'UMR STLO, pour ses conseils et sa patience

Je voudrais également remercier Olivia MENARD, Marie-Françoise COCHET et Pascaline HAMON pour leur sympathie et leur accueil chaleureux

J'adresse aussi mes remerciements à Monsieur Sébastien HUET, mon enseignant référant, pour sa disponibilité et sa réactivité

Au final mes vifs remerciements vont 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 ça été un réel plaisir de faire partie de cette équipe

Sommaire

I.	Introduction	1
I.1.	Relations entre alimentation et santé.....	1
I.2.	La digestion gastrique : une étape clé	1
I.3.	Les modèles de digestion gastrique <i>in vitro</i>	2
I.4.	Hydrolyse des protéines par la pepsine dans le cas des aliments solides	3
I.5.	Hypothèses et objectifs scientifiques du stage	4
II.	Matériels et Méthodes	4
II.1.	Réactifs utilisés	4
II.2.	Préparation des gels de blanc d'œuf.....	5
II.3.	Digestions gastriques <i>in vitro</i> semi-dynamiques à l'aide d'un prototype de cellule milli-fluidique	5
II.3.1.	Protocole de digestion <i>in vitro</i>	5
II.3.2.	Dispositif expérimental pour suivre la digestion en milli-fluidique.....	6
II.4.	Mesures d'activité de la pepsine	8
II.5.	Analyse d'images	9
II.6.	Dosages par UV des peptides produits.....	10
III.	Résultats	10
III.1.	Optimisation des paramètres de conduite de la digestion gastrique.....	10
III.1.1.	Mode d'acquisition des images avec la caméra CCD	10
III.1.2.	Compromis entre le débit de la pompe et la température du bain marie	11
III.1.3.	Expérience de digestion sans pepsine avec le protocole optimisé	12
III.2.	Dosage des peptides produits pendant la digestion par mesure UV.....	13
III.3.	Impact de la formulation des gels de blanc d'œuf sur la cinétique de digestion.....	14
III.3.1.	Impact du pH des gels de blanc d'œuf à concentration constante en protéines sur la cinétique de digestion.....	14
III.3.2.	Impact de la concentration en protéines des gels de blanc d'œuf à pH constant sur la cinétique de digestion.....	15
IV.	Discussion	16
V.	Conclusion.....	18
VI.	Références bibliographiques	19

Liste des Figures

Figure 1: Evolution du nombre de décès dans le monde entre 2000 et 2012 - Répartition selon les principales causes selon l'OMS	1
Figure 2: Schéma de principe du protocole de digestion statique in vitro INFOGEST. Extrait de Minekus et al. (2014)	3
Figure 3: Schéma de la cellule milli-fluidique	6
Figure 4: Photographie du dispositif complet de suivi in situ de désintégration des particules de gels de protéines par la pepsine	7
Figure 5: Images binarisées montrant l'évolution de la ROI (Region Of Interest) au cours du temps lors d'une digestion	9
Figure 6: Amélioration de la qualité des images acquises avec la caméra CCD. A gauche : image obtenue avec le paramétrage par défaut. A droite : image obtenue après optimisation des paramètres	11
Figure 7: Effet de la température du bain-marie sur l'évolution normalisée de l'aire d'une particule de blanc d'œuf (pH 9, 10% protéines)	11
Figure 8: Evolution de l'aire d'une particule de gel de blanc d'œuf (pH 9, 10% protéines) au cours d'une digestion sans pepsine	13
Figure 9: Absorbance des acides aminés aromatiques au cours de temps lors de la digestion d'un gel de blanc d'œuf (pH 9, 10% protéines)	14
Figure 10: Cinétique d'hydrolyse d'après l'évolution estimée du volume de la particule (à gauche) et du signal en UV à 277 nm (à droite) lors de la digestion d'un gel de blanc d'œuf (pH 9, 10% protéines).	14
Figure 11: Evolution du % de volume des particules estimé par analyse d'images au cours des digestions de gels de blanc d'œuf à pH 9, 7 et 5. Les données représentent la moyenne \pm écart-type sur 3 répétitions.	15
Figure 12: Evolution du % de volume des particules estimé par analyse d'images au cours des digestions de gels de blanc d'œuf à pH 9 contenant 10% et 5% de protéines. Les données représentent la moyenne \pm écart-type sur 3 répétitions.	15
Tableau 1: Activité de la pepsine au cours du temps avec une température au bain-marie de 41 et 47°C	12

Résumé

La désintégration des aliments dans l'estomac humain est extrêmement complexe et fait intervenir différents processus physicochimiques et biochimiques. S'il est connu que la cinétique de digestion des aliments dépend fortement de la composition et de la structure de l'aliment (ex. : liquide ou solide), il est important de chercher à mieux en comprendre les mécanismes sous-jacents. L'objectif principal de mon stage était de développer un nouveau dispositif de digestion gastrique *in vitro* semi-dynamique pour étudier *in situ* la désintégration de particules de gels de protéines par la pepsine. Ce dispositif inclus une cellule milli-fluidique, et des observations spatio-temporelles via l'utilisation d'une caméra CCD. Un protocole adapté au dispositif milli-fluidique a été mis en place, et différents paramètres ont été optimisés pour reproduire au mieux la phase gastrique. La méthodologie développée a ensuite été utilisée pour étudier la désintégration de particules de gels de blanc d'œuf. L'avantage du blanc d'œuf est qu'il s'agit d'un aliment vrai qui offre la possibilité de générer des structures de gels très différentes selon les modalités du traitement technologique, sans avoir à en modifier la composition. Les résultats obtenus démontrent la pertinence du dispositif pour étudier les cinétiques de désintégration des particules alimentaires solides, et permettent d'envisager de nouvelles études aux échelles microscopiques

I. Introduction

I.1. Relations entre alimentation et santé

Depuis plusieurs décennies, nous assistons à une augmentation importante des pathologies liées à l'alimentation, dont le surpoids et ses conséquences telles que les maladies cardiovasculaires ou le diabète (Figure 1). Un défi majeur consiste à produire des aliments sains de haute qualité nutritionnelle, ce qui représente à la fois un enjeu de santé publique et un enjeu stratégique pour le développement et l'innovation dans l'industrie alimentaire. La compréhension du processus de la digestion gastrique, en association avec la composition et la structure des aliments, depuis sa déstructuration physique initiale en bouche jusqu'à l'absorption des nutriments dans l'intestin grêle est d'une importance capitale pour la conception et la fabrication de nouveaux aliments adaptés à nos modes de vie.

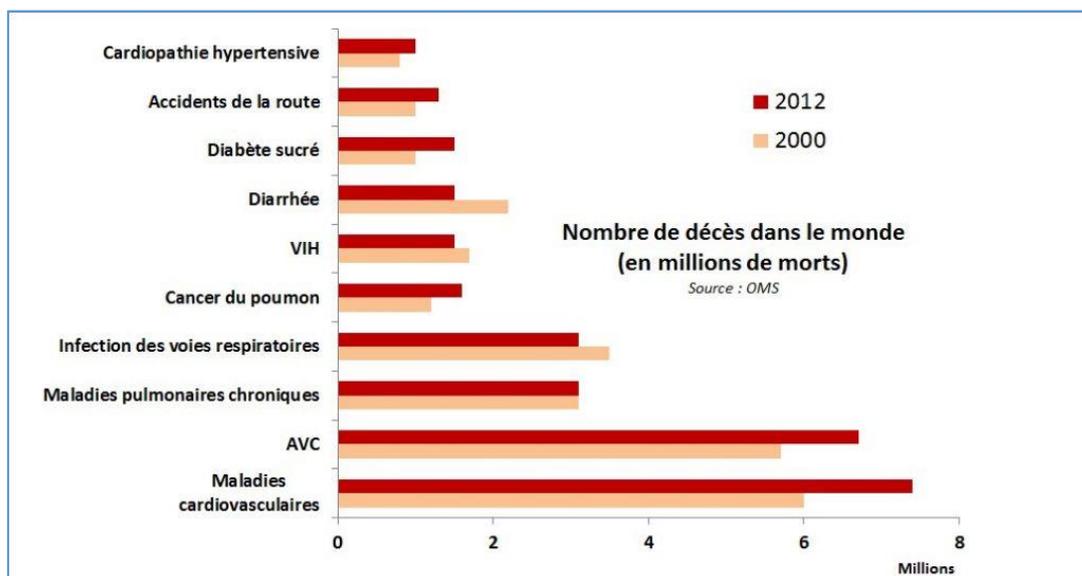


Figure 1: Evolution du nombre de décès dans le monde entre 2000 et 2012 - Répartition selon les principales causes selon l'OMS

I.2. La digestion gastrique : une étape clé

La digestion gastrique est un processus complexe qui fait intervenir différents facteurs : des sécrétions acides, des réactions enzymatiques et des forces mécaniques. Bien que l'absorption des nutriments se réalise dans l'intestin grêle, les cinétiques d'assimilation sont fortement gouvernées par les étapes précédentes, à savoir la phase orale, que l'on peut étudier assez facilement, et la phase gastrique, qui est beaucoup moins accessible aux études expérimentales. L'estomac est par ailleurs le principal site de désintégration des particules alimentaires formées en bouche (F. Kong et Singh 2008). Par conséquent, la digestion gastrique

joue un rôle crucial dans le flux nutriments délivré à l'intestin grêle, situé en aval, et donc dans les cinétiques d'absorption des nutriments (F. Kong et Singh 2008; Hyslop 1980).

Le bol alimentaire formé en bouche consiste en un agglomérat de particules d'aliment(s) imbibés par la salive. A son entrée dans l'estomac, celui-ci va rencontrer des conditions physicochimiques drastiquement modifiées : des sécrétions acides produites par la muqueuse stomacale, l'arrivée d'enzymes hydrolytiques comme la lipase gastrique et la pepsine (la protéase gastrique), et des contractions gastriques produites par les muscles circulaires et longitudinaux qui se trouve au niveau des parois de l'estomac. Si l'ensemble de ces facteurs concourt à la désintégration des particules d'aliments solides, et donc à la vidange de leurs nutriments dans l'intestin grêle, l'influence respective de chacun de ces facteurs n'est pas bien établie. Il paraît donc important de développer des moyens expérimentaux permettant d'étudier les cinétiques de désintégration des particules d'aliments solides dans des conditions gastriques simulées.

I.3. Les modèles de digestion gastrique *in vitro*

La digestion *in vitro* consiste à simuler le processus oral, les phases gastrique et intestinale, et parfois la fermentation colonique en mimant les conditions de digestion humaine. Ces modèles de digestion ont pour objectif de limiter les études *in vivo* souvent onéreuses et difficiles à mettre en place, mais aussi pour éviter des problèmes éthiques (Somaratne, Ferrua, et al. 2020). De très nombreuses études de digestion *in vitro* ont déjà été réalisées pour répondre à des questions de recherche dans différents domaines scientifiques. Il existe principalement deux types de modèles *in vitro* : les modèles statiques et les modèles dynamiques.

Les modèles statiques sont utilisés pour reproduire les différentes phases de la digestion par une succession de réactions en mode batch (conditions constantes de pH, enzymes...). Un protocole, le protocole INFOGEST, est internationalement reconnu à l'échelle mondiale. Celui-ci est issu d'un consensus réalisé dans le cadre d'un réseau international d'experts sur ce thème, et a fait l'objet de deux publications successives (Brodkorb et al. 2019; Minekus et al. 2014). Comme illustré en **Error! Reference source not found.** ce protocole propose d'utiliser des conditions opératoires standardisées (pH, activités enzymatiques, concentrations en électrolytes...) pour chaque étape de la digestion.

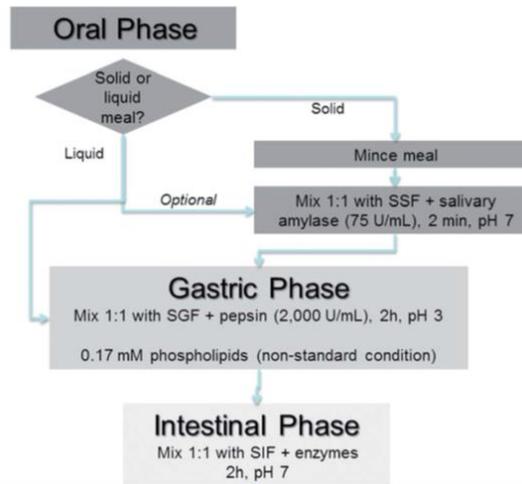


Figure 2: Schéma de principe du protocole de digestion statique *in vitro* INFOGEST. Extrait de Minekus et al. (2014)

Contrairement aux modèles statiques, les modèles de digestion dynamique prennent en compte l'évolution temporelle des conditions biochimiques, de transit, et/ou mécaniques qui ont lieu dans le tube digestif (Dupont et al. 2019). Ces modèles sont plus complexes mais aussi plus pertinents physiologiquement puisqu'ils permettent de réguler la vitesse d'acidification dans la phase gastrique, le flux d'enzymes ou encore la vidange gastro-intestinale (Dupont et al. 2019). Toutefois, ces modèles dynamiques sont relativement complexes, coûteux en temps, nécessitent des quantités plus importantes d'enzymes coûteuses. En fonction des questions de recherche, il est également possible de recourir à l'emploi de protocoles de digestion *in vitro* semi-dynamiques (Mulet-Cabero et al. 2020). Ces protocoles intermédiaires, visent à reproduire la dynamique soit d'une partie seulement des phénomènes (ex. : sécrétions continues mais sans vidange), soit de façon discontinue (ex. : par paliers).

I.4. Hydrolyse des protéines par la pepsine dans le cas des aliments solides

La principale enzyme contenue dans les sécrétions gastriques est la pepsine, qui est la seule protéase présente à ce niveau. Elle est sécrétée sous forme de proenzyme inactive, le pepsinogène, stocké dans les granules des cellules principales et libéré par exocytose (Hunt et al. 2015). Le pepsinogène est activé dans le lumen de l'estomac par les ions H^+ , puis par la pepsine elle-même (autocatalyse) (Minekus et al. 2014). La pepsine hydrolyse les liaisons peptidiques entre les acides aminés constitutifs des protéines, et produit des poly- et oligopeptides.

Le suivi de la dégradation des particules alimentaires par la pepsine consiste généralement à suivre leur cinétique d'érosion (Fanbin Kong et Singh 2011). On peut distinguer deux principaux mécanismes d'érosion de la matrice alimentaire : l'érosion en masse et l'érosion en

surface. La première caractérise une situation où la matrice alimentaire se dégrade uniformément dans toute la masse (von Burkersroda, Schedl, et Göpferich 2002). La seconde caractérise une situation où la matrice alimentaire se dégrade à partir de la surface extérieure au contact des sécrétions gastriques (von Burkersroda, Schedl, et Göpferich 2002)

I.5. Hypothèses et objectifs scientifiques du stage

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.

Comme mentionné précédemment, la phase gastrique est une étape clé de la digestion des aliments semi-solides à solides, et notamment les gels protéiques. La principale enzyme protéolytique présente dans le suc gastrique est la pepsine, qui initie l'hydrolyse des protéines en peptides dans l'environnement acide de l'estomac. Si l'hydrolyse des protéines par la pepsine est relativement bien comprise dans le cas des protéines solubles, peu d'études se sont intéressées aux particules d'aliments solides pour lesquelles on peut suspecter des mécanismes d'érosion différents en fonction de leur composition (ex. : teneur en protéines) et de leur microstructure interne (plus ou moins résistante/accessible à l'hydrolyse). Fort de ce constat, une cellule de milli-fluidique a été récemment développée en collaboration avec l'ENS de Rennes, pour permettre des suivis *in situ* de la désintégration de particules alimentaires durant des digestion gastriques *in vitro*. L'intérêt pour l'équipe BN est de se doter de nouveaux moyens analytiques pour étudier les mécanismes d'action de la pepsine sur des substrats protéiques alimentaires de type gel. C'est dans ce contexte que s'inscrit le sujet de recherche de mon stage, qui concerne le développement d'un protocole de digestion *in vitro* semi-dynamique à l'aide de cette cellule, et de son emploi pour étudier l'impact de la formulation des gels de blanc d'œuf sur leurs cinétiques de désintégration.

II. Matériels et Méthodes

II.1. Réactifs utilisés

De la pepsine extraite de la muqueuse gastrique de porc (P6887) a été obtenue auprès de Sigma-Aldrich, France, ainsi que les produits chimiques pour le dosage de son activité : de l'hémoglobine de sang bovin et de l'acide trichloracétique (TCA). Les différents sels (KCl, NaCl, $MgCl_2(H_2O)_6$, $(NH_4)_2CO_3$, KH_2PO_4), le tampon Tris-HCl, et les solutions de NaOH et

HCl étaient de qualité analytique standard en provenance de différents fournisseurs (Sigma-Aldrich, Merck, PANREAC, J. T. Baker). L'eau était de l'eau Milli-Q.

II.2. Préparation des gels de blanc d'œuf

Le blanc d'œuf utilisé a été extrait à partir d'œufs frais achetés dans le commerce. Il a été séparé à la main le jour de l'achat, ultraturaxé (Digital Homogenizer IKA-T25 avec un axe S25N-/01.814428) pendant 1 min à 10 000 tours par min dans un contenant de 1 L, puis homogénéisé lentement à la spatule pendant 5 min, avant d'être conditionnés en pot de 200 mL et conservés à -20°C. Un même seul et même pot de 200 mL de blanc d'œuf a été utilisé durant le stage. Celui-ci a été décongelé à 4°C pendant une nuit et reconditionné en plus petits volumes (500 µL dans des tubes Eppendorfs), et recongelé, afin de faciliter le stockage et éviter des cycles de décongélation/recongélation. La teneur en protéines du blanc d'œuf a été mesurée à $10,5 \pm 0,1\%$ en protéines par la méthode Kjeldhal (facteur $\times 6,25$), et son pH était de 9. Des gels de blanc d'œuf à environ 10 % de protéines à pH 9, 7 et 5 ainsi que d'autres à 5% de protéines et pH 7 ont été étudiés. Ces gels ont été obtenus après décongélation (30 min à température ambiante) et mélange de 3 Eppendorfs contenant 500 µL solution de blanc d'œuf, dilution éventuelle par 2 (pour les gels à 5% de protéines), ajustement au pH désiré, puis plaçant la solution dans un bain-marie sec à 85°C pendant 4 minutes.

II.3. Digestions gastriques *in vitro* semi-dynamiques à l'aide d'un prototype de cellule milli-fluidique

II.3.1. Protocole de digestion *in vitro*

Le protocole de digestion gastrique *in vitro* semi-dynamique utilisé lors mon stage est basé sur le protocole statique d'INFOGEST (Brodkorb et al. 2019; Minekus et al. 2014). En particulier, nous avons suivi toutes les recommandations faites sur les concentrations en sels (potassium, sodium, magnésium, calcium, ammonium, chlorures, phosphates et hydrogénocarbonates) et sur l'activité de la pepsine (2 000 U/ml) à utiliser durant la digestion gastrique. Pour plus d'information sur ces paramètres, et sur les procédures associées, nous invitons les lecteurs à se référer à l'article de (Brodkorb et al. 2019).

Toutefois, trois principales adaptations ont dû être réalisées pour employer notre dispositif expérimental (voir [section II.3.2.](#)). Premièrement, nous n'avons pas mixé les gels de blanc d'œuf afin d'obtenir la consistance d'une pâte/sauce (comme recommandé) puisque nous nous intéressons à la digestion de particules millimétriques (en meilleure conformité avec la réalité *in vivo*). Deuxièmement, nous n'avons pas respecté la recommandation sur le taux de dilution

à appliquer en phase gastrique (dilution par 2 du bol formé pendant la phase orale) puisque notre dispositif permet un renouvellement en continu des sécrétions apportées. En effet, le protocole statique d'INFOGEST est prévu pour des expériences de digestion en batch (pas d'ajout en cours de digestion). Enfin, nous avons ajusté le pH des sécrétions gastrique à 2.0 dans nos expériences, alors qu'un pH de 3 est recommandé dans le protocole INFOGEST. Cette adaptation se justifie par le fait que le pH de 3 vaut pour un pH à l'équilibre, censé représenter un pH moyen sur l'ensemble de la digestion gastrique. Avec notre dispositif, le pH au sein des particules est initialement élevé (pH de l'aliment) et décroît progressivement via renouvellement en continu des sécrétions simulés.

II.3.2. Dispositif expérimental pour suivre la digestion en milli-fluidique

II.3.2.1 Description du dispositif

L'élément central du dispositif utilisé pour suivre *in situ* les cinétiques de désintégration des particules de gels de blanc d'œuf par la pepsine est une cellule de milli-fluidique. Comme illustré en Figure 3, cette cellule dispose de 5 « parkings » qui permettent d'immobiliser des particules de gel de blanc d'œuf et éviter qu'elles ne soient emportées par le flux de sécrétions (ou SGF, pour « Simulated Gastric Fluid »).

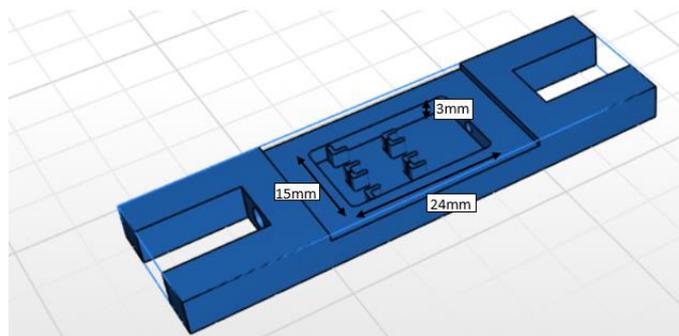


Figure 3: Schéma de la cellule milli-fluidique

Cette cellule est reliée au SGF par des tuyaux à une pompe péristaltique de débit variable (0.1 à 10 ml/min) qui permet de faire circuler, en circuit fermé, la solution de SGF dans la cellule (Figure 4). Ne disposant pas d'enceinte d'incubation thermostatée, le flacon contenant le SGF (50 mL), sous agitation magnétique, est immergé dans un bain-marie dont la température peut être réglée afin d'obtenir une température de 37°C au niveau de la cellule. Une caméra de type Charge Coupled Device (CCD), montée sur trépied, est positionnée au-dessus de la cellule milli-fluidique pour enregistrer une vidéo « time-lapse » de façon à suivre la dégradation des particules d'aliments par la pepsine. Une source de lumière est positionnée en dessous afin d'améliorer les contrastes dans les images. Le système de caméra CCD est connecté à un

logiciel « PFV » avec lequel on peut effectuer le déclenchement de la caméra sans risque de faire bouger le montage.

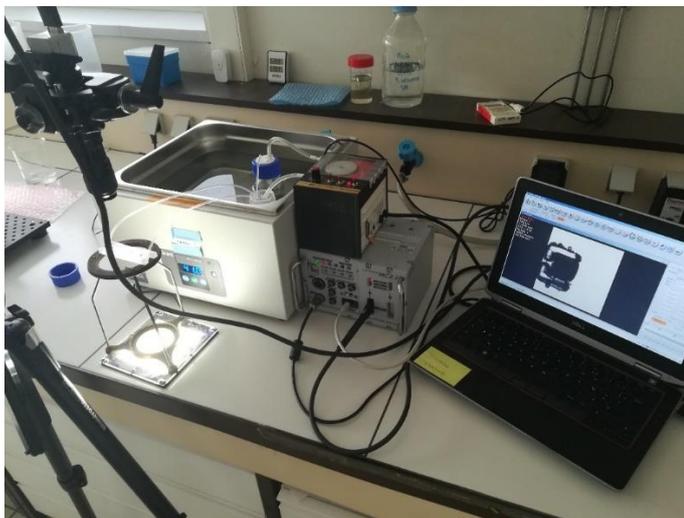


Figure 4: Photographie du dispositif complet de suivi in situ de désintégration des particules de gels de protéines par la pepsine

II.3.2.2 Conditions opératoires

Pour réaliser des digestions à l'aide de ce dispositif, l'ensemble du montage précédemment décrit est mis en place. 50 mL de solution de SGF fraîchement préparée est placée dans le bain-marie à une température préalablement définie pour avoir 37°C dans la cellule. Pendant que le SGF s'équilibre en température, 5 petites particules de gel de blanc d'œuf fraîchement préparé sont découpées à la spatule (environ 1 mm de côté), et sont placées dans les parkings de la cellule milli-fluidique à l'aide d'une pince. La cellule est ensuite refermée hermétiquement à l'aide d'une lamelle en verre et d'un espaceur en résine autocollante. Lorsque que le SGF est équilibré en température, l'enregistrement vidéo avec la caméra CDD est lancé avec le logiciel « PFV » et la pompe péristaltique est démarrée. Il est à noter que sur les 5 particules présentes dans les parkings, une seule est suivie avec la caméra CDD.

Pour optimiser les paramètres du protocole, nous avons effectués des essais :

- avec différents paramètres de réglage d'acquisition avec la caméra CDD
- avec différents débits de pompe, à 10, 5 et 1 ml/min
- avec différentes températures au niveau du bain-marie contenant le SGF.
- sans pepsine dans le SGF, pour vérifier que les particules ne se désintègrent pas en absence de la protéase.

Dans sa version optimisée, le protocole utilise :

- Les paramètres suivants pour la caméra CCD : une fréquence d'acquisition de 125 images par seconde, une vitesse d'obturation de 1/250 s, un intervalle de nombre de déclenchement de la caméra de 30, et une répétition de déclenchement de la caméra de 250.
- Un débit de 5 ml/min avec la pompe péristaltique.
- Une température du bain marie de 41°C

Après optimisation des paramètres du protocole (présentée dans la partie résultats), des digestions ont été réalisées en triplicata avec les gels de blanc d'œuf contenant 10% de protéines à pH 9, 7 et 5, et les gels contenant 5% de protéines à pH 7. Durant ces expériences, des prélèvements de 1 ml ont également été réalisés à t = 0, 30, 60, 90 et 120 min dans le flacon de SGF, en vue de doser les peptides libérés par spectroscopie UV (voir section [II.7](#)). Des expériences complémentaires ont également été réalisées pour suivre l'évolution de l'activité de la pepsine au cours du temps dans ces conditions.

II.4. Mesures d'activité de la pepsine

La pepsine, comme toutes les enzymes, est susceptible de perdre en activité lorsqu'elle est maintenue à sa température de fonctionnement, ou au-delà, sur de longues périodes. Des mesures d'activité de la pepsine ont donc été réalisées dans la solution digestive au cours de digestions gastriques avec le protocole optimisé. Pour cela, des prélèvements de 1 ml ont été effectués dans la solution de SGF à t = 0 (avant de démarrer la digestion), 60, 120 et 180 min.

Le principe général de la méthode est de doser les peptides (par spectrophotométrie à 280 nm) produits après 10 min d'hydrolyse d'une solution d'hémoglobine par la pepsine à pH 2, 37°C (Anson 1938). Pour cela, en amont sont préparés :

- Un tampon Tris-HCl à 50 mM et NaCl à 150 mM ajusté à pH 6.5 avec de l'HCl 1M.
- Une solution d'hémoglobine à 2% (p/v), en réhydratant 0.5 g de poudre d'hémoglobine dans 20 ml d'eau, puis en ajustant le pH à 2.0 avec de l'HCl 300 mM avant de compléter le volume à 25 ml avec de l'eau.

Les prélèvements ont été immédiatement dilués 6 fois dans le tampon afin d'obtenir une solution de pepsine stabilisé (pH 6.5) à environ 100 µg/ml, puis conservés sur glace jusqu'à analyse (dans l'heure qui suit). Juste avant l'essai, deux nouvelles dilutions sont réalisées avec de l'HCl 10 mM pour obtenir des solutions à 20 et 30 µg/ml de pepsine à pH 2.0 (pH de la réaction d'hydrolyse). Pour réaliser la réaction d'hydrolyse, 500 µl de la solution d'hémoglobine à 2% sont placés dans 4 tubes Eppendorf de 2 ml : 1'échantillon test et 1 blanc

pour chaque concentration enzymatique à tester (20 et 30 µg/ml). Les tubes sont incubés à 37 °C pendant 4 min afin d'atteindre l'équilibre de température, puis nous ajoutons 100 µl de pepsine aux différentes concentrations dans les échantillons tests (aucun ajout à ce stade pour les blancs), et laissons incuber pendant 10 min exactement. On arrête la réaction en ajoutant 1 ml de TCA à 5% à chaque tube (blancs inclus). On ajoute enfin 100 µl de solution de pepsine aux différentes concentrations dans les blancs. Les 4 tubes sont ensuite centrifugés à 6 000 g pendant 30 min à 21°C. L'absorbance à 280 nm est ensuite mesurée sur les surnageants. L'activité enzymatique est ensuite calculée avec la formule suivante :

$$Units/ml = \frac{[A280_{test} - A280_{Blanc}]}{(dt * C)} \times 1000$$

Avec $A280_{test}$ et $A280_{Blanc}$: l'absorbance à 280 nm pour les solutions de pepsine et pour les blancs, dt : la durée de la réaction (10 min), C : la concentration de la solution de pepsine testée (mg/ml).

II.5. Analyse d'images

L'analyse des images obtenues par le système de camera CCD a été réalisée à l'aide du logiciel Fiji (Schindelin et al. 2012). Les images ont été binarisées avec un algorithme de seuillage parmi les méthodes « Défaut », « Triangle » ou des autres options du progiciel Fiji. Comme la focalisation de l'image sur les particules et les niveaux de contraste entre la particule et le fond était variable d'une expérience à l'autre, la sélection de la méthode de seuillage a été réalisé au cas par cas sur validation visuelle. La méthode retenue était celle qui permettait la visualisation la plus claire des contours des particules d'intérêt sur l'ensemble de la pile d'images. Les ROI (Region Of Intertest) entourant les particules ont été obtenues dans les contreparties binaires (**Error! Reference source not found.**).

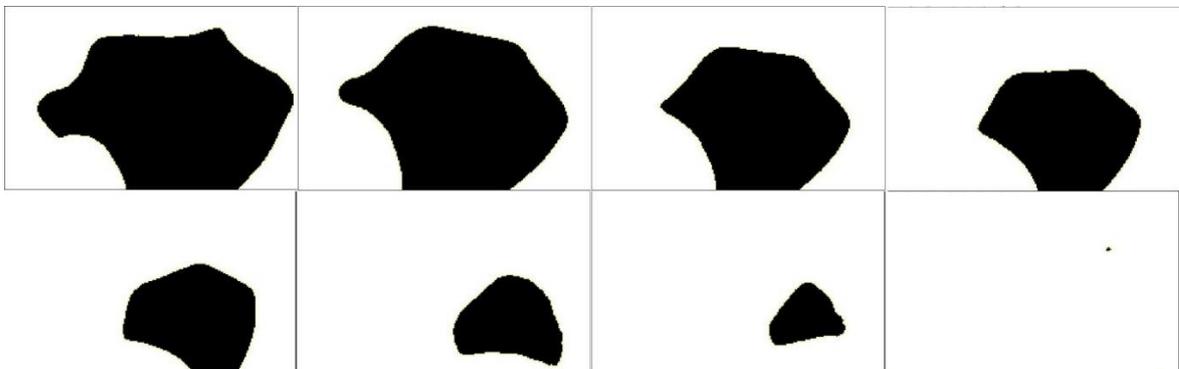


Figure 5: Images binarisées montrant l'évolution de la ROI (Region Of Intertest) au cours du temps lors d'une digestion

Une analyse de la pile d'image a ensuite été effectuée pour récupérer l'évolution de l'aire des particules dans les images. Ces aires ont ensuite été converties en équivalent volume en supposant des particules sphériques via la relation suivante :

$$Volume (\%) = \frac{\frac{4}{3} \times \pi \times \left(\frac{A_t}{\pi}\right)^{\frac{3}{2}}}{\frac{4}{3} \times \pi \times \left(\frac{A_{t=0}}{\pi}\right)^{\frac{3}{2}}} \times 100$$

Avec A_t et $A_{t=0}$ les aires de la particule dans les images au temps t et à $t = 0$.

Ce calcul permet d'approximer l'évolution du volume de la particule, et donc de sa masse (en supposant une masse volumique de 1 g/cm^3), en vue de comparer ces résultats avec les dosages de peptides réalisés en UV.

II.6. Dosages par UV des peptides produits

La spectrométrie UV est une méthode qui permet de mesurer l'absorption d'un rayonnement dans une gamme de longueurs d'onde allant de 200 à 400 nm. L'échantillon reçoit un rayonnement d'une certaine intensité, en absorbe une partie, en transmet une autre, et diffuse le reste. Il est possible de déterminer la concentration en protéines et/ou peptides d'un échantillon à partir de la quantité de rayonnement absorbée à une longueur d'onde de 280 nm. L'absorption de la lumière à cette longueur d'onde est en effet caractéristique des acides aminés aromatiques contenus dans les peptides et les protéines.

Pour réaliser les mesures, 1 ml des prélèvements effectués durant la digestion sont conditionnés dans une cuvette en quartz. Des spectres d'absorbance ont ensuite été acquis entre 250 et 350 nm. Le maximum d'absorbance, situé à 277 nm dans nos échantillons, a été utilisé pour évaluer l'évolution de la concentration en protéines/peptides dans nos échantillons en supposant une concentration en peptides nulle à $t = 0$, et maximale à $t = 120 \text{ min}$.

III. Résultats

III.1. Optimisation des paramètres de conduite de la digestion gastrique

III.1.1. Mode d'acquisition des images avec la caméra CCD

Plusieurs paramètres d'acquisition peuvent moduler la qualité des images obtenues avec la caméra CCD. Comme l'illustre la Figure 6, les images acquises avec le paramétrage par défaut faisaient apparaître un fond gris sombre qui contrastait faiblement avec la particule de blanc d'œuf. Différents essais ont donc été effectués pour améliorer le contraste dans les images, et faciliter leur traitement automatique ultérieur. Les paramètres retenus sont : une fréquence

d'acquisition de 125 images/s, une vitesse d'obturation de 1/250 s, un intervalle de nombre de déclenchement de la caméra de 30, et une répétition de déclenchement de la caméra de 250.

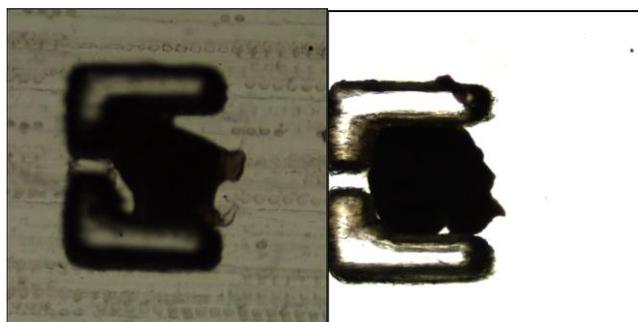


Figure 6: Amélioration de la qualité des images acquises avec la caméra CCD. A gauche : image obtenue avec le paramétrage par défaut. A droite : image obtenue après optimisation des paramètres

III.1.2. Compromis entre le débit de la pompe et la température du bain marie

La longueur émergée du tuyau reliant le SGF à la cellule milli-fluidique, le débit de la pompe, et la température du bain marie qui tempère le SGF sont 3 paramètres influant sur la température au niveau de la cellule. Celle-ci doit impérativement être de 37°C pour simuler la digestion gastrique. Après avoir raccourci au minimum la longueur de tuyau émergée, nous avons en première approche fixé le débit de la pompe à 1 ml/min. Afin d'obtenir une température de 37°C au niveau de la cellule dans ces conditions, nous avons déterminé que la température du bain-marie devait être mise à 47°C. Toutefois, les résultats obtenus par analyse d'image sur des gels de blanc d'œuf (pH 9, 10% protéines) dans ces conditions suggéraient fortement que la pepsine n'était plus active dans ces conditions (Figure 7).

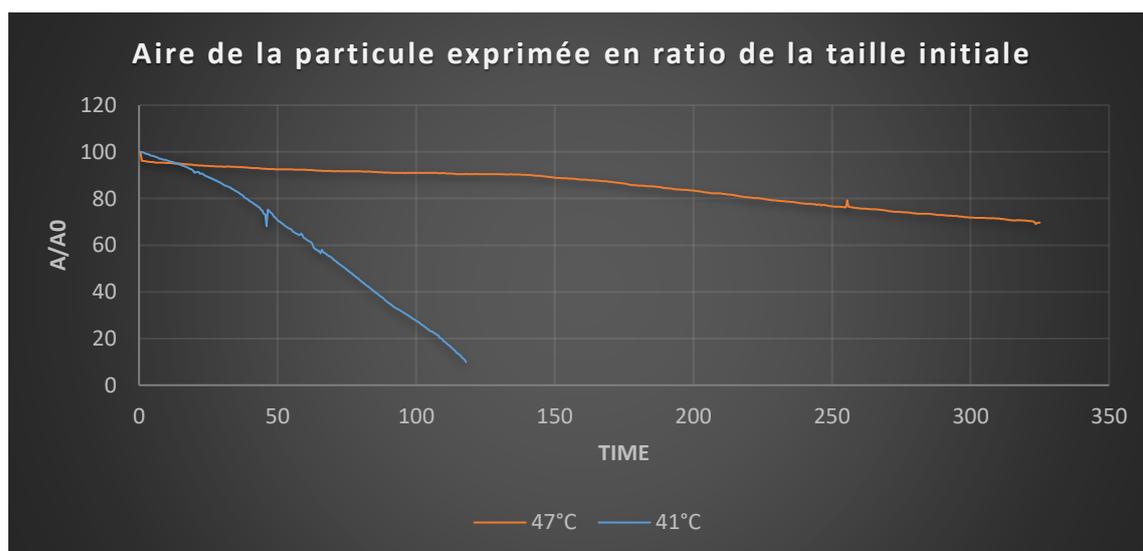


Figure 7: Effet de la température du bain-marie sur l'évolution normalisée de l'aire d'une particule de blanc d'œuf (pH 9, 10% protéines)

En effet, une telle température est susceptible d'inactiver rapidement et irréversiblement la pepsine. Nous avons donc étudié l'évolution de l'activité de la pepsine dans le SGF dans ces conditions de digestion. Les résultats, présentés dans Tableau 1, confirment une perte d'activité importante et rapide (perte de ~ 50% en 1 h, 75 % en 2 h) de la pepsine lorsque la solution de SGF qui contient la pepsine est conservée à 47°C.

Dans un second temps, nous avons donc décidé de trouver une température pour laquelle la perte d'activité de la pepsine puisse être considérée comme raisonnable, en descendant progressivement la température par pas de 2°C. Les résultats obtenus à 41°C (Tableau 1), avec une perte d'activité d'environ 20% en 2h, et permettant une digestion quasi-complète d'une particule dans ce laps de temps (Figure 7), ont été jugés satisfaisants. Des expériences complémentaires ont ensuite permis de déterminer que le débit minimum permettant d'atteindre 37°C au niveau de la cellule dans ces conditions était de 5 ml/min. Les paramètres de débit de pompe et de température du bain-marie ont donc été fixés à 5 ml/min et 41°C dans le protocole optimisé.

Temps de digestion	Activité de la pepsine (U/ml)	
	Bain-marie à 47°C	Bain-marie à 41°C
0 min	2065	2076
1h	1125	1836
2h	406	1680
3h	78	906

Tableau 1: Activité de la pepsine au cours du temps avec une température au bain-marie de 41 et 47°C

III.1.3. Expérience de digestion sans pepsine avec le protocole optimisé

Il est parfois suggéré dans la littérature scientifique que la forte acidité des sécrétions gastriques peut induire une désintégration progressive des particules d'aliment. Il nous paraissait donc important de vérifier qu'une particule de blanc d'œuf ne se désintègre pas en absence de pepsine. Nous avons donc utilisé le protocole optimisé, mais sans pepsine, sur une particule de gel de blanc d'œuf (pH 9, 10% protéines). Les résultats d'analyse d'image, présentés en Figure 8, montrent une aire de particule constante sur plus de 2h d'expérience. Ces données démontrent qu'en présence de pepsine, la dégradation des particules vues par analyse d'image peut être entièrement attribuée à l'hydrolyse enzymatique des protéines des gels de blanc d'œuf.

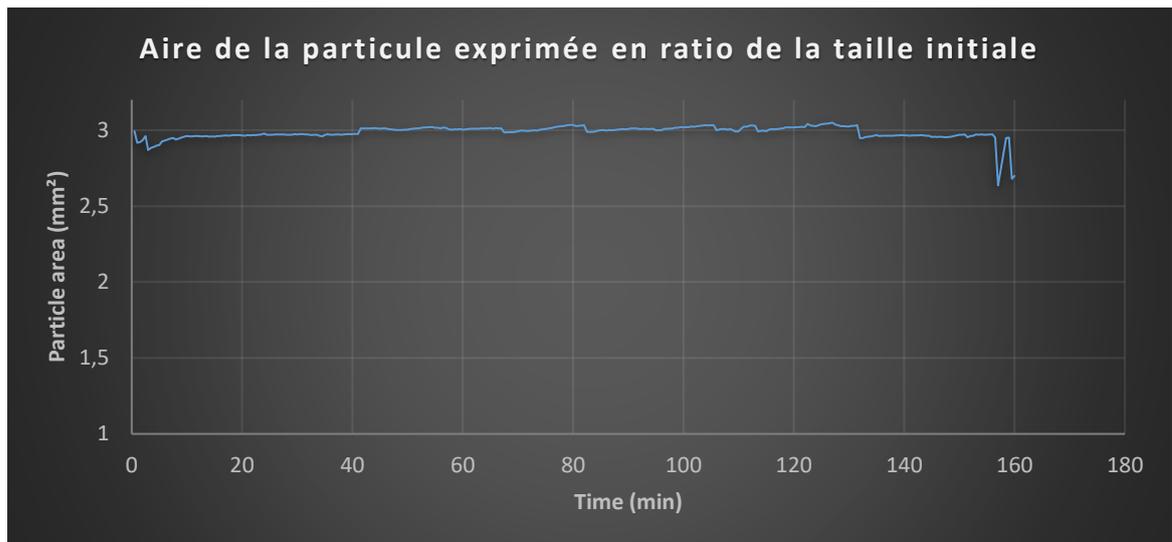


Figure 8: Evolution de l'aire d'une particule de gel de blanc d'œuf (pH 9, 10% protéines) au cours d'une digestion sans pepsine

III.2. Dosage des peptides produits pendant la digestion par mesure UV

L'évolution de la quantité de matière protéique libérée par les particules de gels dans le SGF a été estimée par spectroscopie UV pour toutes les digestions réalisées avec le protocole optimisé (c'est-à-dire sur les triplicatas des 4 gels de blanc d'œuf). La Figure 9 montre la série de spectres UV obtenue lors d'une de ces digestions (un gel à pH 9, 10% de protéines). Le spectre à $t = 0$ correspond au signal provenant des acides aminés aromatiques contenus dans la pepsine. Au fur et à mesure de la digestion, le spectre augmente très légèrement en intensité, reflétant ainsi la contribution additionnelle des peptides libérés par les 5 particules de gel de blanc d'œuf présentes dans les parkings de la cellule milli-fluidique.

Comme le montre la Figure 10, l'augmentation de la quantité de peptides estimée en UV se corrélait bien dans cette expérience avec la décroissance calculée du volume de la particule suivi avec la caméra CCD. Toutefois, cette bonne concordance des résultats n'a été observée que dans environ 50% des expériences, l'évolution du signal en UV étant régulièrement incohérente. Ceci s'explique par les erreurs expérimentales importantes en UV liées à la faible quantité de protéines contenues dans les particules de gels (de l'ordre du mg dans les 5 particules) par rapport à la quantité de pepsine (~ 85 mg dans les 50 ml de SGF). Les données obtenues en UV n'ont donc pas pu être exploitées pour l'ensemble des digestions.

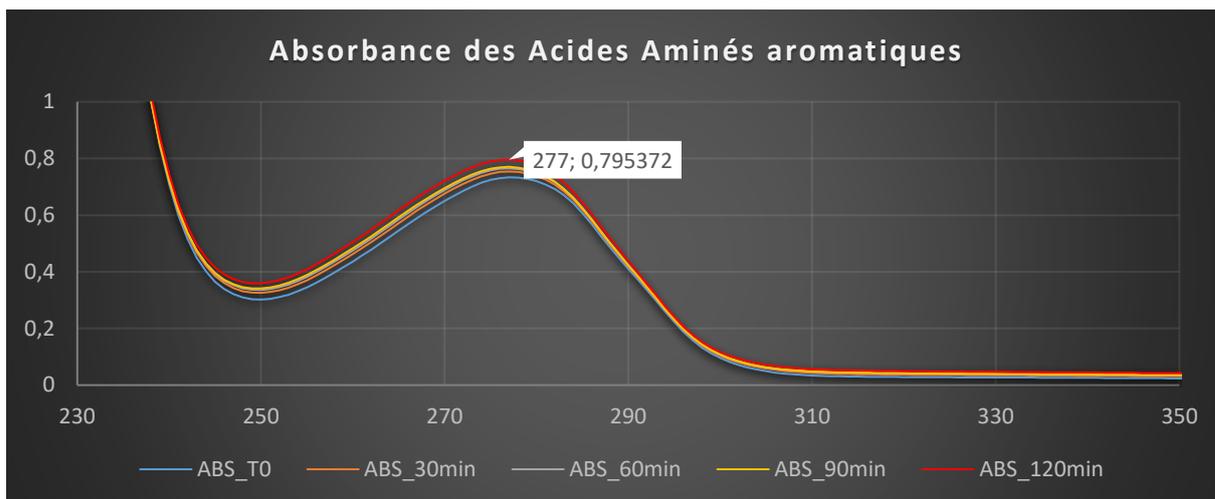


Figure 9: Absorbance des acides aminés aromatiques au cours de temps lors de la digestion d'un gel de blanc d'œuf (pH 9, 10% protéines)

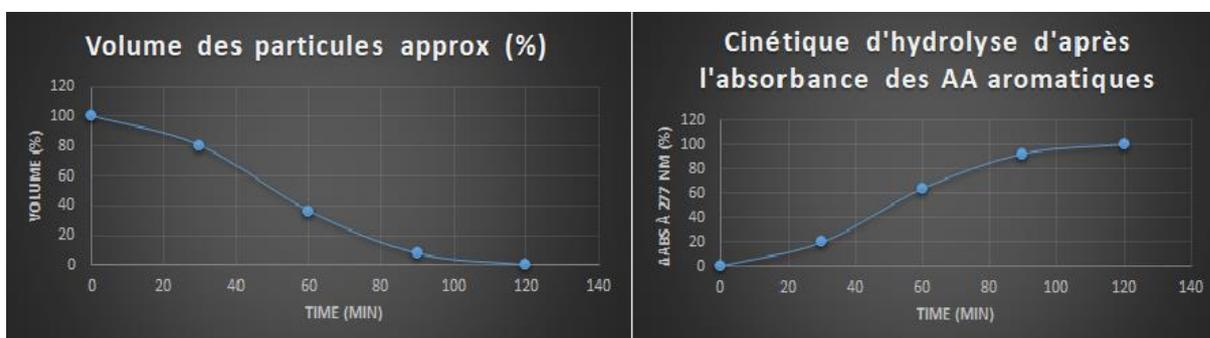


Figure 10: Cinétique d'hydrolyse d'après l'évolution estimée du volume de la particule (à gauche) et du signal en UV à 277 nm (à droite) lors de la digestion d'un gel de blanc d'œuf (pH 9, 10% protéines).

III.3. Impact de la formulation des gels de blanc d'œuf sur la cinétique de digestion

III.3.1. Impact du pH des gels de blanc d'œuf à concentration constante en protéines sur la cinétique de digestion

L'activité de la pepsine est fortement dépendante du pH (Campos et Sancho 2003), et peut aussi être modulée par la microstructure des gels protéiques. Or, il est justement possible de faire des gels de blanc d'œuf de microstructures différentes en jouant sur le pH des solutions avant thermo-coagulation. A géométrie équivalente, des particules de gel de blanc d'œuf à différents pH sont donc susceptibles de présenter des cinétiques de digestion gastrique contrastées. Pour mettre à l'épreuve cette hypothèse, nous avons réalisé une série d'expériences de digestion *in vitro* avec des gels de blanc d'œuf à pH 9, 7 et 5. La Figure 11 présente les résultats (moyenne \pm écart-type sur 3 répétitions) des analyses d'images. Contrairement à ce que l'on pouvait supposer, les résultats obtenus ne montrent aucune différence significative dans les cinétiques de digestion des différents gels de blanc d'œuf.

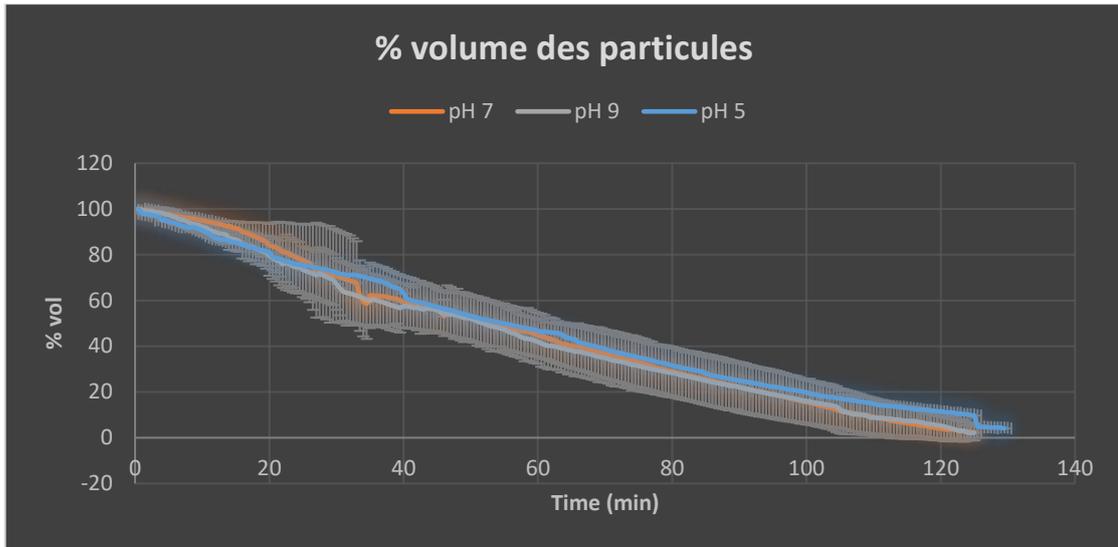


Figure 11: Evolution du % de volume des particules estimé par analyse d'images au cours des digestions de gels de blanc d'œuf à pH 9, 7 et 5. Les données représentent la moyenne \pm écart-type sur 3 répétitions.

III.3.2. Impact de la concentration en protéines des gels de blanc d'œuf à pH constant sur la cinétique de digestion

La microstructure, les propriétés mécaniques, ainsi que l'effet tampon des gels de protéines dépendent principalement de leur teneur en protéines. Nous avons également étudié l'impact de la concentration en protéines des gels de blanc d'œuf sur leurs cinétiques de digestion. La Figure 12 présente les résultats (moyenne \pm écart-type sur 3 répétitions) des analyses d'images pour des digestions de gels de blanc d'œuf à pH 7 contenant soit 10% de protéines, soit 5% de protéines. A nouveau, aucune différence significative n'a été observée dans les cinétiques de digestion des différents gels de blanc d'œuf.

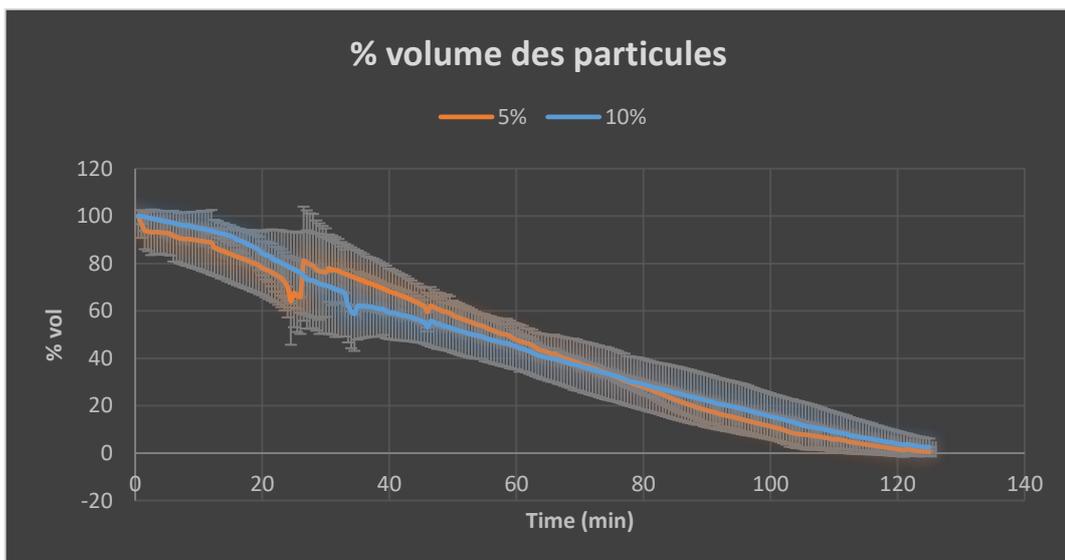


Figure 12: Evolution du % de volume des particules estimé par analyse d'images au cours des digestions de gels de blanc d'œuf à pH 9 contenant 10% et 5% de protéines. Les données représentent la moyenne \pm écart-type sur 3 répétitions.

IV. Discussion

L'objectif premier de mon stage était d'ordre méthodologique, en lien avec le développement et l'optimisation d'un protocole de digestion *in vitro* semi-dynamique employant une cellule milli-fluidique. Mon travail a permis de concevoir un montage, de définir un protocole de digestion semi-dynamique associé à ce montage, de démontrer l'intérêt d'employer une caméra CCD pour suivre les digestions avec une très bonne qualité d'image et une très bonne résolution temporelle, ainsi que de valider une procédure d'analyse semi-automatique des images ainsi obtenues. Ces résultats sont très prometteurs pour suivre de façon simple et rapide la digestion de particules alimentaires millimétriques. En effet, les questions autour des mécanismes limitant la digestion des particules d'aliments sont récentes, et si différents groupes ont développé des dispositifs de micro-fluidique pour étudier la digestion de gouttelettes lipidiques ou de protéines solubles (Ashammakhi et al. 2020; Marze, Algaba, et Marquis 2014), à notre connaissance, il n'existe pas à ce jour de dispositifs de milli-fluidique pour étudier la digestion de particules alimentaire millimétriques.

Au niveau du dispositif, la contrainte la plus importante a été de trouver un compromis raisonnable entre la température au niveau de la cellule milli-fluidique, qui doit être 37°C, la température du bain-marie qui doit réchauffer le SGF sans inactiver la pepsine, et le débit de la pompe qui permet de renouveler le SGF au niveau de la cellule qui ne doit être ni trop lent ni trop rapide. Nous avons pu montrer qu'une température du bain-marie supérieure à 41°C inactive trop rapidement la pepsine pour permettre des suivis sur 2 h de digestion, durée typique d'une digestion gastrique *in vitro*. Ainsi, dans tout montage de digestion gastrique *in vitro*, il semble essentiel de conserver la pepsine à une température de 41°C maximum. Pour compenser la perte de chaleur dans le tuyau reliant la pompe péristaltique à la cellule, nous avons ensuite déterminé qu'un débit de 5 ml/min était nécessaire à la pompe pour avoir une température de 37°C au niveau de la cellule. En valeur absolue, un tel débit est compatible avec les données disponibles chez l'homme et le porc. En effet, des débits de sécrétion gastrique de l'ordre du ml/min à plus de 10 ml/min après ingestion d'un repas sont typiquement décrits dans littérature (Malagelada, Go, et Summerskill 1979). Toutefois, ces débits sont valables pour un repas complet, tandis que notre dispositif est prévu pour digérer 1 à 5 particules millimétriques. Nous pouvons donc supposer que le débit utilisé induit un renouvellement du fluide gastrique au niveau des particules bien supérieur à celui qui s'opère réellement dans un estomac humain.

Il est important de noter que ces contraintes d'ordres techniques pourraient être totalement levées via l'emploi d'une enceinte thermostatée au niveau de la cellule. C'est une stratégie que nous avons discutée mais qui n'a pas été retenue durant mon stage. L'argument principal que nous avons retenu était qu'il semblait préférable de d'abord mettre en évidence la nécessité de recourir à un tel dispositif, qui rajoutera nécessairement d'autres contraintes au niveau du montage, notamment pour l'acquisition des images avec la caméra CCD, mais aussi en vue de pouvoir substituer ultérieurement la caméra CCD par un microscope confocal (dont dispose le STLO).

Au niveau méthodologique, nous avons également pu montrer qu'il est possible de suivre par une approche complémentaire, via des mesures en UV, la cinétique moyenne de digestion des 5 particules présentes dans la cellule milli-fluidique. Toutefois, si l'idée apparaît pertinente, le signal très important de la pepsine gêne l'estimation de la quantité de peptides libérés. Pour surmonter ce problème, une possibilité serait de faire fabriquer une cellule de milli-fluidique plus grande, contenant plus de particules, pour augmenter la quantité totale de peptides libérés.

Le second objectif de mon stage visait à étudier, à l'aide du dispositif mis en place, l'impact de paramètres de formulation de gels de blanc d'œuf sur les cinétiques de désintégration de leurs particules. Nous avons joué sur le pH des gels de blanc d'œuf, qui est en soit un paramètre important pour l'activité de la pepsine (Campos et Sancho 2003), et qui est également connu pour modifier la microstructure du réseau protéique. En effet, il est connu que le blanc d'œuf gélifié à pH 5 présente une microstructure ouverte et hétérogène, que le blanc d'œuf gélifié à pH 9 présente une structure plus dense et homogène, et que le blanc d'œuf gélifié à pH 7 présente une microstructure intermédiaire. Malgré des effets attendus de pH et de microstructure, nous n'avons pas vu de différences dans les cinétiques de digestion de ces gels. Ceci contraste avec une précédente étude *in vitro* réalisée dans le laboratoire dans laquelle il n'y avait aucun renouvellement des sécrétions gastriques (Somaratne, Nau, et al. 2020). De la même manière, nous nous attendions à voir un effet de la concentration en protéines des gels sur les cinétiques de digestion, mais nous avons obtenus des résultats similaires pour des gels de blanc d'œuf à pH 9 contenant 10 et 5% de protéines.

Le manque d'effet du pH, de la microstructure, et de la concentration des gels sur la cinétique de désintégration suggère que les conditions utilisées dans le protocole ont gommé les différences potentielles. Au vu des résultats de (Somaratne, Nau, et al. 2020) précédemment cités, nous pouvons supposer que ceci peut s'expliquer par le débit de pompe, analysé a

posteriori comme très important. Il est en effet possible que les cinétiques de désintégration observées aient été principalement gouvernées par le renouvellement rapide du fluide gastrique au niveau de la cellule, gommant ainsi des comportements possiblement différents. Si la valeur du débit théorique à appliquer n'est pas simple à estimer, des essais en diminuant progressivement le débit de pompe pourraient être réalisés pour caractériser l'influence de ce paramètre sur les cinétiques de désintégration.

V. Conclusion

L'approche de digestion in vitro semi-dynamique proposée, basée sur un système d'imagerie time-lapse adapté à la cellule milli-fluidique, semble très intéressante pour étudier en temps réel et avec une haute résolution temporelle la dégradation spatio-temporelle de particules alimentaires millimétriques. Les principaux points d'amélioration concernent la possibilité de thermostatée la cellule milli-fluidique de façon autonome sans gêner l'acquisition d'image. Ceci permettrait d'abaisser le débit de la pompe à une valeur qui reste à déterminer plus précisément. Il semble que celui-ci était trop important dans nos expériences, et que le renouvellement rapide du SGF au niveau des particules nous a empêché de mettre en évidence des effets attendus sur les cinétiques de désintégration de particules de gel de blanc d'œuf. Une fois validé, un tel dispositif pourrait être utilisé en microscopie confocale avec un double marquage de la protéine de l'hydrogel et de l'enzyme, pour caractériser les mécanismes en jeu lors de la digestion des particules d'aliments à l'échelle microscopique. Cette nouvelle connaissance pourrait contribuer à aider l'industrie alimentaire à développer de nouvelles formulations mieux adaptées au besoin nutritionnels de la population générale et/ou des sous-groupes de la population (sportifs, séniors, etc.).

VI. Références bibliographiques

- Anson, M. L. 1938. « THE ESTIMATION OF PEPSIN, TRYPSIN, PAPAIN, AND CATHEPSIN WITH HEMOGLOBIN ». *The Journal of General Physiology* 22 (1): 79-89.
- Ashammakhi, Nureddin, Rohollah Nasiri, Natan Roberto de Barros, Peyton Tebon, Jai Thakor, Marcus Goudie, Amir Shamloo, Martin G. Martin, et Ali Khademhosseini. 2020. « Gut-on-a-Chip: Current Progress and Future Opportunities ». *Biomaterials* 255 (octobre): 120196. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120196>.
- Brodkorb, André, Lotti Egger, Marie Alminger, Paula Alvito, Ricardo Assunção, Simon Ballance, Torsten Bohn, et al. 2019. « INFOGEST Static in Vitro Simulation of Gastrointestinal Food Digestion ». *Nature Protocols* 14 (4): 991-1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>.
- Burkersroda, Friederike von, Luise Schedl, et Achim Göpferich. 2002. « Why Degradable Polymers Undergo Surface Erosion or Bulk Erosion ». *Biomaterials* 23 (21): 4221-31. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(02\)00170-9](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00170-9).
- Campos, Luis Alberto, et Javier Sancho. 2003. « The Active Site of Pepsin Is Formed in the Intermediate Conformation Dominant at Mildly Acidic PH ». *FEBS Letters* 538 (1): 89-95. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00152-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00152-2).
- Dupont, D., M. Alric, S. Blanquet-Diot, G. Bornhorst, C. Cueva, A. Deglaire, S. Denis, et al. 2019. « Can dynamic in vitro digestion systems mimic the physiological reality? » *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59 (10): 1546-62. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1421900>.
- Hunt, R. H., M. Camilleri, S. E. Crowe, E. M. El-Omar, J. G. Fox, E. J. Kuipers, P. Malfertheiner, et al. 2015. « The Stomach in Health and Disease ». *Gut* 64 (10): 1650-68. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307595>.
- Hyslop, E. J. 1980. « Stomach Contents Analysis—a Review of Methods and Their Application ». *Journal of Fish Biology* 17 (4): 411-29. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1980.tb02775.x>.
- Kong, F., et R. P. Singh. 2008. « Disintegration of Solid Foods in Human Stomach ». *Journal of Food Science* 73 (5): R67-80. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00766.x>.
- Kong, Fanbin, et R. Paul Singh. 2011. « Solid Loss of Carrots During Simulated Gastric Digestion ». *Food Biophysics* 6 (1): 84-93. <https://doi.org/10.1007/s11483-010-9178-8>.
- Malagelada, J. R., V. L. Go, et W. H. Summerskill. 1979. « Different Gastric, Pancreatic, and Biliary Responses to Solid-Liquid or Homogenized Meals ». *Digestive Diseases and Sciences* 24 (2): 101-10. <https://doi.org/10.1007/BF01324736>.
- Marze, Sébastien, Hugo Algaba, et Mélanie Marquis. 2014. « A Microfluidic Device to Study the Digestion of Trapped Lipid Droplets ». *Food & Function* 5 (7): 1481-88. <https://doi.org/10.1039/C4FO00010B>.
- Minekus, M., M. Alminger, P. Alvito, S. Ballance, T. Bohn, C. Bourlieu, F. Carrière, et al. 2014. « A Standardised Static in Vitro Digestion Method Suitable for Food - an International Consensus ». *Food & Function* 5 (6): 1113-24. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>.
- Mulet-Cabero, Ana-Isabel, Lotti Egger, Reto Portmann, Olivia Ménard, Sébastien Marze, Mans Minekus, Steven Le Feunteun, et al. 2020. « A Standardised Semi-Dynamic in Vitro Digestion Method Suitable for Food - an International Consensus ». *Food & Function* 11 (2): 1702-20. <https://doi.org/10.1039/c9fo01293a>.
- Schindelin, Johannes, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch, Stephan Preibisch, et al. 2012. « Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis ». *Nature Methods* 9 (7): 676-82. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
- Somaratne, Geeshani, Maria J. Ferrua, Aiqian Ye, Francoise Nau, Juliane Floury, Didier Dupont, et Jaspreet Singh. 2020. « Food Material Properties as Determining Factors in Nutrient Release during Human Gastric Digestion: A Review ». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 60 (22): 3753-69. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1707770>.
- Somaratne, Geeshani, Francoise Nau, Maria J. Ferrua, Jaspreet Singh, Aiqian Ye, Didier Dupont, R. Paul Singh, et Juliane Floury. 2020. « Characterization of Egg White Gel Microstructure and Its Relationship with Pepsin Diffusivity ». *Food Hydrocolloids* 98 (janvier): 105258. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105258>.

Abstract

Recent studies have shown an important increase in diet-related diseases, including overweight and its consequences such as cardiovascular diseases or diabetes. A major challenge is to produce healthy foods of high nutritional quality, which is both a public health issue and a strategic issue for development and innovation in the food industry. Understanding the role of processes during gastric digestion, in association with the composition and structure of food during the digestion process, from its initial physical breakdown in the mouth to the transformation and absorption of nutrients throughout the gastrointestinal tract is of paramount importance for the design and manufacture of novel foods with specific target behaviour in the body.

Moreover, the disintegration of food in the human stomach is extremely complex and involves various physicochemical processes, most notably the gastric phase, which is a key step in the digestion of semi-solid to solid foods, including protein gels. The main proteolytic enzyme present in the gastric juice is pepsin, which initiates the hydrolysis of proteins into peptides in the acidic environment of the stomach. The kinetics of food digestion are highly dependent on the composition and structure of the food, so it is important to understand the underlying mechanisms.

The main objective of my internship was to develop a new semi-dynamic in vitro gastric digestion device to study in situ the disintegration of protein gel particles by pepsin. It includes a milli-fluidic device, and spatiotemporal observations via the use of a CCD camera. A protocol adapted to the milli-fluidic device has been set up, it is called INFOGEST and is internationally recognised. It is the result of a consensus reached within the framework of an international network of experts on this subject, and has been the subject of two successive publications.

The methodology developed was then used to study the disintegration of egg white gel particles. The advantage of egg white is that it is a true food that offers the possibility of generating very different gel structures depending on the technological treatment, without having to modify the composition. The most important constraint was to find a reasonable compromise between the temperature at the level of the milli-fluidic device, which must be 37°C, the temperature of the water bath which must warm the SGF without inactivating the

pepsin, and the flow rate of the pump which allows the SGF to be renewed at the level of the cell, which must be neither too slow nor too fast.

The second objective of my internship was to study, with the help of the device set up, the impact of egg white gel formulation parameters on the disintegration kinetics of their particles. We played with the pH of the egg white gels, which is an important parameter for the activity of pepsin. Despite the expected effects of pH and microstructure, we did not see any differences in the digestion kinetics of these gels.

The main points of improvement in our experiments concern the possibility to thermostat the milli-fluidic device autonomously without interfering with image acquisition. This would make it possible to lower the pump flow rate to a value that remains to be determined more precisely. Indeed, it seems that the rapid turnover of SGF at the particle level prevented us from highlighting expected effects on the disintegration kinetics of egg white gel particles. Once validated, such a device could be used in confocal microscopy with double labelling of the hydrogel protein and the enzyme, to characterise the mechanisms involved in the digestion of food particles at the microscopic scale. This new knowledge could help the food industry to develop new formulations better adapted to the nutritional needs of the general population and/or sub-groups of the population.