



HAL
open science

Impact de la salivation sur la digestion gastrique de lait

Tino Jamme

► **To cite this version:**

Tino Jamme. Impact de la salivation sur la digestion gastrique de lait. Alimentation et Nutrition. 2022. hal-03695740

HAL Id: hal-03695740

<https://hal.inrae.fr/hal-03695740>

Submitted on 15 Jun 2022

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

Rapport de stage

« Impact de la salivation sur la digestion gastrique de lait »



Stage du : 04 avril au : 10 juin 2022

Lieu de stage : INRAE – UMR STLO Rennes

Maître de stage : Martine MORZEL

Tutrice de stage : Céline LOISEAU

Confidentiel : NON

Remerciements

J'aimerais, dans un premier temps, remercier Mme MORZEL, ma maîtresse de stage, pour son accueil dans l'équipe Bioactivité & Nutrition à l'UMR STLO de Rennes et au sein de son projet VOLTIGE. Merci également pour les nombreuses explications apportées pour comprendre et mener à bien mon stage mais aussi pour l'autonomie et la confiance accordée lors des différentes manipulations.

J'aimerais également remercier M. Yves LE LOIR, directeur de l'UMR, mais aussi M. Didier DUPONT, responsable de l'équipe Bioactivité & Nutrition.

Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont pu m'aider à mener à bien mon projet. Je pense tout particulièrement Florence ROUSSEAU, Marie-Hélène FAMELART, Jordane OSSEMOND et Yann LE GOUAR, sans oublier toute l'équipe pédagogique du département Génie Biologique de l'IUT de Laval pour les enseignements apportés.

Liste des abréviations

Abréviation	Libellé complet
AG	Acide gras
GC-MS	Chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
ANOVA	Analysis of variance
BN	Bioactivité et Nutrition
DUT	Diplôme universitaire technologique
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
INRAE	Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement
IRSTEA	Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture
IUT	Institut universitaire technologique
QSP	Quantité suffisante pour
RGE	Extrait gastrique de lapin (Rabbit Gastric Extract)
Sal	Salive
SGF	Solution de fluide gastrique (Simulated Gastric Fluid)
SSF	Solution de fluide salivaire (Simulated Salivary Fluid)
STLO	Science et Technologie de Lait et de l'Œuf
UMR	Unité Mixte de Recherche
Vf	Volume final

Liste des figures et des tableaux

Figure 1 : Schéma de la digestion statique *in vitro* selon la méthode INFOGEST

Figure 2 : Glandes salivaires majeures et canaux sécrétoires chez l'Homme

Figure 3 : Diffraction de la lumière selon la taille des particules

Figure 4 : Schéma du granulomètre

Figure 5 : Photo du rhéomètre

Figure 6 : Distribution de la taille des particules dans un lait entier et un lait entier à pH 3

Figure 7 : D4-3 moyens pour chaque chyme : lait entier mélangé avec des volumes de salive ou SSF variables (min et max)

Figure 8 : Contrainte en fonction du gradient de cisaillement de 10 à 500 s⁻¹ pour trois réplicats biologiques de lait entier avec un volume de SSF maximum

Figure 9 : Seuils moyens pour chaque chyme : lait entier mélangé avec des volumes de salive ou SSF variables (min et max)

Figure 10 : Viscosités plastiques moyennes pour chaque chyme : lait entier mélangé avec des volumes de salive ou SSF variables (min et max)

Figure 11 : Suivi de la lipolyse pendant la digestion pour chaque chyme : lait entier mélangé avec des volumes de salive ou SSF variables (min et max).

Tableau 1 : Préparation des chymes de lait entier

Tableau 2 : Composition du milieu réactionnel en phase gastrique

Tableau 3 : Mode opératoire kit NEFA FS

Table des matières

Introduction	0
I. Présentation de la structure d'accueil	1
1. L'INRAE	1
2. L'UMR STLO.....	1
II. Présentation du sujet de stage.....	2
1. Contexte scientifique	2
2. Stratégie expérimentale.....	4
III. Matériel et Méthodes	5
1. Préparation des chymes.....	5
2. Caractérisation des chymes	5
a) Mesure de la taille des particules.....	5
b) Mesures rhéologiques.....	6
3. Digestion statique.....	7
a) Dosage de l'activité pepsine dans le RGE	7
b) Conditions de digestion.....	8
c) Dosage des acides gras libres	8
4. Statistiques.....	9
IV. Résultats et interprétations.....	10
1. Mesure de la taille des particules	10
2. Mesures rhéologiques	12
3. Dosage des acides libres	14
Discussion et perspectives.....	15
Bilan personnel	16
Liste des références.....	17
Annexes.....	18

Introduction

L'humanité et la planète font face à un changement global qui crée de nouvelles attentes vis-à-vis de la recherche : atténuation et adaptation au changement climatique, sécurité alimentaire et nutritionnelle, transition des agricultures, préservation des ressources naturelles, restauration de la biodiversité, anticipation et gestion des risques. S'y ajoutent des enjeux plus locaux qui incluent les conditions de vie et de rémunération des agriculteurs, la compétitivité économique des entreprises, l'aménagement des territoires, l'accès à une alimentation saine et diversifiée pour chacun.

Dans le cadre de mon DUT Génie Biologique option Analyses Biologique et Biochimiques à l'IUT de Laval, j'ai souhaité réaliser mon stage dans une entreprise répondant à ces enjeux du futur en matière d'alimentation tout en me formant aux métiers de technicien de laboratoire dans le secteur de la recherche.

J'ai donc cherché à intégrer une équipe de recherche de l'INRAE pour pouvoir découvrir le secteur de la recherche mais également attiré par leurs travaux qui sont reconnus mondialement.

J'ai alors pu intégrer l'équipe de Bioactivité et Nutrition (BN) de l'UMR STLO, dirigée par Didier DUPONT.

Le projet sur lequel j'ai pu travailler est porté par ma maîtresse de stage Martine MORZEL, chargée de recherche. Le projet, baptisé « VOLTIGE » (vitesse d'ingestion, structure de bol alimentaire et digestion) a pour but de vérifier plusieurs hypothèses sur la digestion d'une matrice laitière en fonction de sa manipulation en bouche. Les hypothèses sont les suivantes :

- H1. Une vitesse d'ingestion rapide est associée à un bol alimentaire moins déstructuré
- H2. Le taux d'insalivation du bol ne dépend pas de la vitesse d'ingestion
- H3. L'hydrolyse digestive par les enzymes gastriques et pancréatiques est plus faible et/ou plus lente pour des bols moins déstructurés
- H4. Le flux salivaire module la lipolyse digestive

Mon stage a porté sur cette quatrième hypothèse, avec pour intitulé : L'impact de la salivation sur la digestion gastrique de lait.

I. Présentation de la structure d'accueil

1. L'INRAE

L'INRAE, l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement, est né le 1^{er} janvier 2020. Il est issu de la fusion entre l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) et l'IRSTEA (Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture). Il est le premier organisme de recherche spécialisé sur ses trois domaines scientifiques. Il regroupe plus de 10 000 agents répartis dans 18 centres de recherche localisés dans toute la France. Ces centres sont répartis dans 14 départements scientifiques spécialisés dans des domaines variés (biologie, génétique, numérique, etc.) pour pouvoir répondre à de nombreux projets de recherche.

2. L'UMR STLO

L'UMR (Unité Mixte de Recherche) STLO (Science et Technologie du Lait et de L'Œuf) a pour objectif de générer des connaissances sur les constituants du lait et de l'œuf, d'éco-concevoir les principaux procédés qui leur sont appliqués, de maîtriser leurs conséquences fonctionnelles et nutritionnelles et de comprendre les mécanismes biologiques, biochimiques et physiques impliqués dans leur transformation ou leur altération. Le lait et l'œuf constituent les principaux objets d'études. Il comporte 83 personnes permanents dont 34 scientifiques, 25 doctorants et environ 10 masters. L'organisation de l'UMR comporte un directeur, deux directeurs adjoints ainsi que cinq équipes de recherche qui travaillent en étroite collaboration. Les différentes équipes sont l'équipe de microbiologie des filières lait et œuf dirigée par M. Éric GUEDON, l'équipe des procédés de séparation à membrane dirigée par Geneviève GESAN-GUIZIOU, l'équipe des interactions structure-fonctionnalité dirigée par Saïd BOUHALLAB, l'équipe séchage-matrices concentrées-fonctionnalités dirigée par Cécile LE FLOCH-FOUERE et, pour finir, l'équipe de Bioactivité et Nutrition dirigée par Didier DUPONT, dans laquelle j'ai effectué mon stage.

II. Présentation du sujet de stage

1. Contexte scientifique

La digestion consiste à transformer mécaniquement et chimiquement les aliments en éléments nutritifs que le corps peut absorber. Cette digestion a un rôle de simplification moléculaire, à savoir la transformation des macromolécules en nutriments. Chez l'Homme, cette digestion se décompose en plusieurs étapes. La 1^{ère} est la phase orale. Celle-ci réduit les aliments en particules et permet de mélanger la nourriture à la salive. Ce mélange permet de former le bol alimentaire. La déglutition envoie ensuite les aliments jusqu'à l'estomac. On appelle le contenu gastrique le chyme. La digestion gastrique est essentiellement chimique. Dans l'estomac, le chyme est malaxé. Ces mouvements péristaltiques vont favoriser l'action du suc gastrique renfermant deux principales enzymes, la pepsine, une protéase qui permet l'hydrolyse des protéines, et la lipase gastrique qui permet d'hydrolyser les lipides en acides gras. Après cela, la vidange gastrique permet de transférer le chyme dans l'intestin où la digestion se poursuit grâce au suc pancréatique et la bile, et où s'effectue l'absorption des nutriments.

Pour éviter de recourir à des modèles humains ou animaux, des modèles *in vitro* existent comme par exemple les protocoles INFOGEST qui reproduisent la digestion chez l'homme. Nous avons utilisé le protocole statique proposé et harmonisé entre les chercheurs du réseau international INFOGEST. En point final, il donne une bonne corrélation avec les données *in vivo*. Cette méthode comporte trois étapes successives de digestion, d'une durée définie, et se déroule dans un bain marie à 37°C sous agitation (Figure 1).

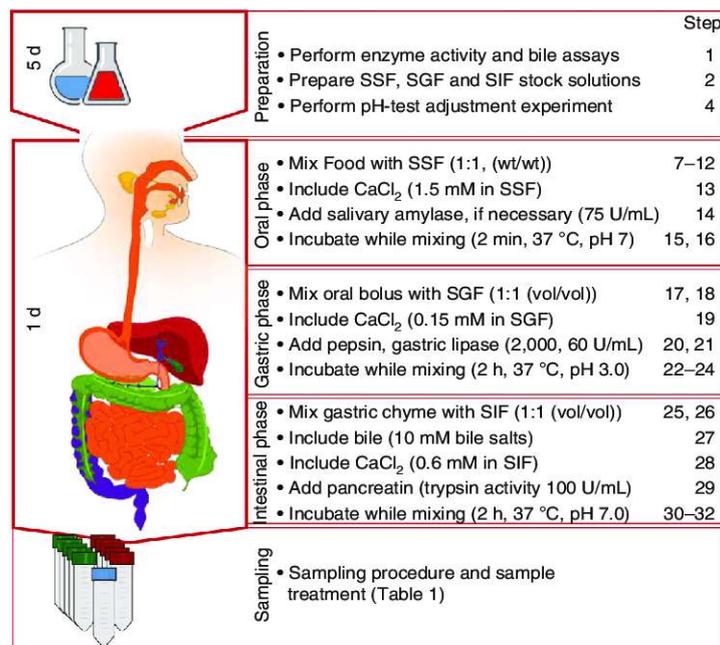
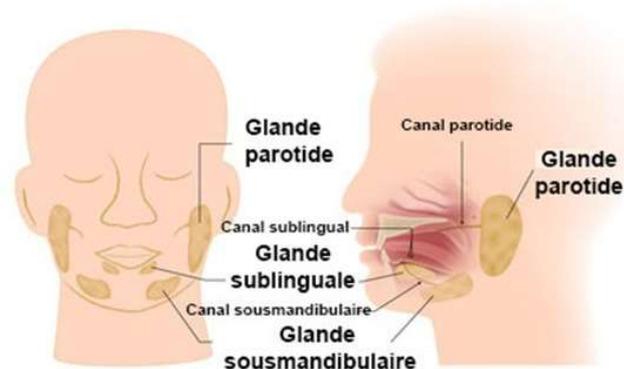


Figure 1 : Schéma de la digestion statique *in vitro* selon la méthode INFOGEST (Brodkorb et al., 2019)

Le protocole de référence comporte une phase orale d'une durée de 2 min, une phase gastrique d'une durée de 2 heures et une phase intestinale d'une durée de 2 heures également. Le point fort de ce protocole est la possibilité de contrôler le temps de digestion, la température du mélange, les conditions ioniques (grâce à des solutions ioniques modèles, par exemple la solution SSF qui traduit la composition ionique de la salive) mais surtout l'activité enzymatique lors de la digestion.

Le projet VOLTIGE s'inscrit donc dans l'étude de cette digestion et plus précisément cherche à mettre en évidence un lien entre la phase orale et la phase gastrique en s'intéressant à l'impact de la salive sur la digestion.

La salive est un fluide sécrété par des glandes salivaires puis déversé dans la bouche via des canaux (figure 2). Elle est composée principalement d'eau mais aussi de protéines, dont des enzymes et des mucines.



[Figure 2 : Glandes salivaires majeures et canaux sécrétoires chez l'Homme](https://www.docteurcliv.com)

<https://www.docteurcliv.com>

L'enzyme la plus abondante est l' α -amylase qui décompose l'amidon en maltose en hydrolysant les liaisons glycosidiques, cette activité ayant été mise en évidence dès 1831. Une autre enzyme de la salive, dont la présence est encore débattue, est la lipase linguale. Celle-ci décompose une petite fraction des triglycérides alimentaires dans la cavité buccale et l'estomac (Hamosh and Burns, 1977). La lipase linguale est toutefois considérée comme ayant une importance limitée dans la lipolyse des individus en bonne santé, alors qu'elle peut avoir une importance plus importante chez les patients atteints de mucoviscidose et d'insuffisance pancréatique exocrine en raison du manque d'activité de la lipase pancréatique (Abrams et al., 1984). De plus, l'activité de la lipase linguale pré-duodénale peut aussi compenser le déficit de développement de la lipase pancréatique chez les nouveau-né (Smith et al., 1986).

D'autres composants majoritaires de la salive sont les mucines, dont la plus importante est la MUC5B. Cette molécule est une grande protéine fortement glycosylée qui donne l'aspect visqueux à la salive et confère également ses propriétés lubrifiantes à la salive. Les résultats

d'une étude indiquent également que la mucine est le principal composant de la salive responsable de l'agrégation des particules alimentaires lors de la formation du bol alimentaire (Vingerhoeds et al., 2005).

La composition de la salive varie d'une personne à l'autre suivant son état physiologique, son âge, son état de santé, etc. Cette variabilité entre individus se retrouve aussi dans les flux de salive. Des personnes vont produire de plus grande quantité de salive au cours de la journée que d'autres. Cette variabilité a été évaluée à 500mL de salive par jour pour une personne qui ne salive pas beaucoup à 1.5L pour une personne qui salive beaucoup (Humphrey and Williamson, 2001), soit environ 0.5 et 1.5 ml/min sur le temps éveillé, respectivement. Cette variabilité a donc été prise en compte lors des différents tests.

2. Stratégie expérimentale

Le but principal est de reproduire au mieux, *in vitro*, la digestion gastrique humaine pour pouvoir observer si la salive a un impact sur cette digestion. Pour cela nous avons produit *in vitro* et caractérisé des chymes composés de lait entier, de fluide oral en volume variable (correspondant aux valeurs hautes et basses mesurées chez l'humain) et de fluide gastrique.

Le volume de salive ou SSF à incorporer est défini comme celui apporté au chyme pendant le temps de résidence de l'aliment dans l'estomac. Le temps de demi-vidange gastrique doit donc être déterminé. Pour cela il faut appliquer la formule définie par (Hunt and Stubbs, 1975) :

$$T_{0,5} = V \times (0,1797 - 0,1670e^{-K})$$

$T_{0,5}$ = temps de demi-vidange (min), V = Volume ingéré (ml), K = densité calorique (kcal/ml^{-1})

Donc pour 200 ml de lait entier qui a pour densité calorique 0,65 kcal/ml, le temps de demi-vidange est de 18,5 min. Après avoir déterminé le temps de demi-vidange, le volume de salive à ajouter en est déduit pour les flux bas (0.5 mL/min) et haut (1.5 mL /min). Pour 200 mL de Lait entier on ajoutera 9 mL en bas flux et 28 mL en haut flux de salive.

Une fois ces chymes réalisés, on y a mesuré la taille des particules et des propriétés rhéologiques. Dans un second temps, une digestion statique de ces chymes est réalisée selon le protocole INFOGEST (Brodkorb et al., 2019). Des prélèvements au cours de la digestion sont réalisés pour pouvoir suivre la lipolyse au cours de la digestion gastrique.

III. Matériel et Méthodes

1. Préparation des chymes

Les chymes sont préparés à partir de lait entier mélangé avec des volumes de salive (Sal) ou de SSF variables, correspondant aux valeurs basses (min) et hautes (max) mesurées chez l'humain. À cela va s'ajouter une solution de SGF ainsi qu'un ajustement du pH à 3 qui est celui présent dans l'estomac. Les échantillons sont préparés de la façon suivante (tableau 1) :

Tableau 1 : Préparation des chymes de lait entier

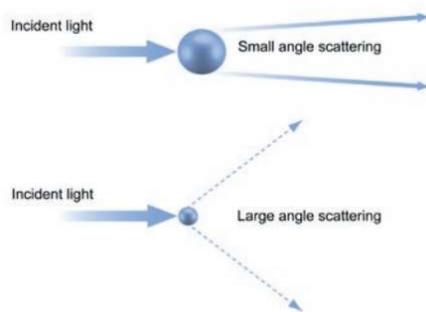
Echantillon	Volume de lait (mL)	Volume de fluide oral (mL)	Volume de SGF	pH
SSF min	20	0,9	QSP 41,8 mL	3
SSF max	20	2,8	QSP 45,6 mL	3
Sal min	20	0,9	QSP 41,8 mL	3
Sal max	20	2,8	QSP 45,6 mL	3

Chaque échantillon est préparé et analysé 3 fois, à des jours différents, pour vérifier la répétabilité biologique des résultats obtenus.

2. Caractérisation des chymes

a) Mesure de la taille des particules

La mesure de la taille des particules est appelée granulométrie. Il s'agit d'étudier la distribution de la taille des particules présentes au sein d'un échantillon. L'échantillon peut être soit sec



comme de la poudre soit liquide comme une émulsion ou du chyme. Cette granulométrie est réalisée grâce à un granulomètre (mastersizer). Le principe de cet appareil est de faire passer des particules à travers un rayon laser fixe. Chaque particule diffracte la lumière selon un angle qui est fonction de sa taille. Plus la particule est petite est plus la diffraction de la lumière sera grande (Figure 3).

Figure 3 : Diffraction de la lumière selon la taille des particules (<https://www.sympatec.fr>)

La lumière diffractée est recueillie par des détecteurs (Figure 4). L'image de diffraction obtenue est transformée en utilisant la théorie de Mie dans laquelle les particules sont modélisées comme

des sphères. Le résultat est illustré sous forme de courbe semi-logarithmique, qui décrit la distribution de taille des particules en μm exprimée en pourcentage du volume total des particules.

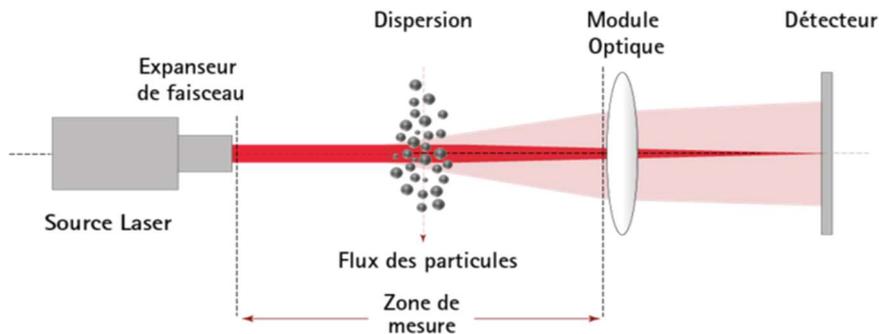


Figure 4 : Schéma du granulomètre (<https://www.sympatec.fr>)

Trois mesures de granulométrie sont effectuées pour chaque échantillon (réplicats techniques) et une moyenne est calculée. Par ailleurs, trois réplicats biologiques (échantillons préparés indépendamment) sont caractérisés pour chaque échantillon.

b) Mesures rhéologiques

La rhéologie est une branche de la mécanique qui étudie le comportement de la matière sous l'influence de contraintes. Elle a pour objet d'analyser les comportements mécaniques des substances



Figure 5 : Photo du rhéomètre

Un rhéomètre est un instrument de précision qui maintient le matériau étudié dans une certaine configuration géométrique, contrôle son environnement, tout en appliquant et mesurant un large éventail de forces et de contraintes. Il est composé d'une cuve thermostatée où l'échantillon est déposé ainsi que d'un rotor qui va descendre dans la cuve et entrer en contact avec l'échantillon. L'espace séparant le rotor et la cuve est appelé entrefer. Dans notre cas nous avons utilisé le MCR301 du constructeur Anton Paar.

Le test utilisé est un test d'écoulement qui applique un cisaillement (s^{-1}) croissant à l'échantillon et mesure une contrainte de cisaillement (Pa). On peut également calculer à partir de ces données une viscosité ($\text{mPa}\cdot\text{s}$)

Dans notre cas, le chyme était préparé comme dans le tableau 1 (en travaillant à partir de fluides et de lait thermostatés à 25°C) puis il était agité pendant 3 minutes. Il était ensuite placé dans le

rhéomètre thermostaté à 25°C et la mesure était lancée en utilisant la géométrie coaxiale CC17 composée d'un rotor et d'une cuve. La viscosité du chyme était alors mesurée pour des gradients de cisaillement compris entre 10 et 500 s⁻¹.

3. Digestion statique

a) Dosage de l'activité pepsine dans le RGE

En phase gastrique, nous souhaitons apporter deux enzymes, la pepsine et la lipase gastrique. Les conditions finales à obtenir sont une activité pepsine de 2000 U/mL et une activité lipase de 60 U/mL. Pour apporter la lipase gastrique nous utilisons de l'extrait gastrique de lapin (RGE). Il faut savoir que le RGE apporte aussi une certaine quantité de pepsine, dont il faudra tenir compte dans le calcul des quantités d'enzymes à utiliser. En effet un lot d'enzyme purifié n'a pas forcément la même activité enzymatique qu'un autre lot. Chaque lot doit donc être analysé pour en connaître l'activité exprimée en Unité par milligramme (U/mg). Cela représente la quantité d'enzyme nécessaire pour transformer une micromole de substrat en une minute dans des conditions de température et pH définies.

L'activité lipasique du RGE que nous avons utilisé était connue mais il a été nécessaire de caractériser son activité pepsine. Nous avons utilisé le protocole présenté en Annexe 1. Le principe repose sur la détermination des peptides solubles dans le TCA libérés suite à l'hydrolyse par la pepsine de l'hémoglobine et détectés par spectrophotométrie à 280 nm (pH 2, 37 °C)



L'unité est définie comme la quantité d'enzyme qui produira un ΔA_{280} de 0.001 par minute à pH2 et 37°C.

Dans un premier temps, pour chaque concentration d'une gamme de pepsine et deux blancs, des tubes Eppendorf sont préparés. 500 μL d'une solution d'hémoglobine (préparée en amont à une concentration de 2%) sont ajoutés dans chaque tube. La température des tubes est ensuite équilibrée à 37°C. 100 μL de pepsine sont ajoutés et incubés exactement 10 minutes puis la réaction est stoppée en ajoutant 1mL de TCA (concentration 5%). Dans le cas des blancs, après l'ajout du TCA, 100 μL de pepsine la plus concentrée est ajouté. Après centrifugation à 6000 g pendant 30 minutes, l'absorbance du surnageant peut être mesurée au spectrophotomètre à 280nm ce qui permet d'obtenir une courbe d'étalonnage. Ce même protocole est appliqué à l'échantillon de RGE afin d'en déterminer l'activité. Dans notre cas nous avons obtenu une activité de pepsine de 136 U/mg qui sera prise en compte pour calculer la quantité de pepsine purifiée à ajouter en phase gastrique.

b) Conditions de digestion

Nous avons utilisé le protocole INFOGEST statique mais avec des modifications. En particulier la quantité de fluide oral incorporée dans le lait a été calculée comme dans le paragraphe II.2. Quant à la durée de la phase gastrique, celle-ci a été raccourcie à 1 heure car un aliment liquide a besoin de moins de temps qu'un aliment solide pour être digéré

Les milieux réactionnels sont préparés suivant le Tableau 2.

Tableau 2 : Composition du milieu réactionnel en phase gastrique

Solution	Volume	Rôle
Mélange lait + fluide oral	5 mL	
SGF	4 mL	Reproduire la composition ionique du fluide gastrique
HCl	V _{HCL}	faire descendre le pH du mélange à 3
Eau	498 µL - V _{HCL}	
CaCl ₂	2,5 µL	Nécessaire à l'activité des enzymes
RGE	0,25 mL	Fournir de la lipase qui permet d'hydrolyser les lipides
Pepsine	0,25 mL	Hydrolyser les protéines

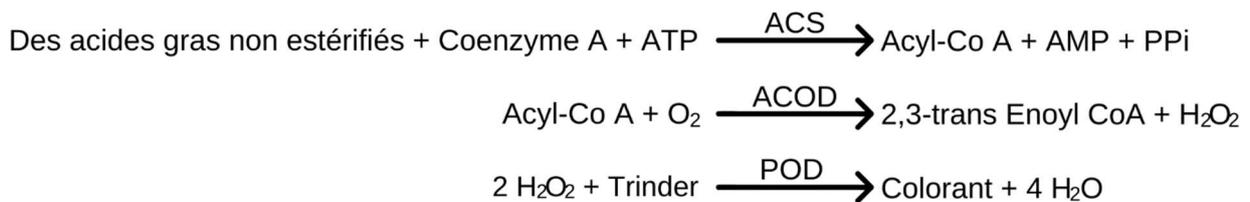
Vf = 10 mL

Après ajout des enzymes, des prélèvements sont réalisés à 5, 15, 30 et 60 min. Le volume prélevé est alors placé dans un tube Eppendorf qui contient un inhibiteur de la lipase gastrique. Les prélèvements sont ensuite conservés à -20°C avant leur dosage.

c) Dosage des acides gras libres

Le kit NEFA FS est normalement utilisé pour doser par spectrophotométrie les acides gras non estérifiés dans le sérum ou plasma de patients. Ici il sera utilisé dans les prélèvements effectués lors de la digestion gastrique afin de suivre la lipolyse.

Le principe de ce dosage est décrit ci-dessous :



En présence de coenzyme A et d'ATP, les acides gras non-estérifiés réagissent grâce à l'activité de l'Acyl CoA synthétase (ACS) pour former le coenzyme A acylé. Du H₂O₂ se libère pendant l'oxydation du coenzyme A acylé par l'acyl-CoA oxydase (ACOD). Sous l'effet catalytique de la peroxydase (POD), le H₂O₂ réagit avec la substance Trinder pour former un produit final coloré. C'est l'absorbance de ce produit qui est mesurée à 546nm pour déterminer la concentration en acides gras non estérifiés

Le mode opératoire est décrit dans le Tableau 3.

[Tableau 3 : Mode opératoire kit NEFA FS](#)

	Blanc	Echantillon/ Standard
Echantillon/Standard	-	20 µL
Eau distillée	20 µL	-
Réactif 1	1000 µL	1000 µL
Mélanger et incuber pendant 5 minutes. Lire l'absorbance A1, puis ajouter :		
Réactif 2	250 µL	250 µL
Mélanger et incuber 10 minutes. Lire l'absorbance A2 dans un délai de 20 min.		

Le réactif 1 a pour rôle d'apporter les coenzyme A, l'ATP, l'acyl CoA Synthétase (ACS) et aussi de tamponner le milieu réactionnel à un pH de 7. Le réactif 2, quant à lui, apporte l'Acyl CoA Oxydase (ACOD), la peroxydase (POD) et également de tamponner le pH du milieu à 7.

Une courbe d'étalonnage est faite avec des concentrations d'acide gras libres de 0 à 1 mmol/L. Grâce à celle-ci, la concentration en mmol/L des échantillons peut être calculée après mesure de leurs absorbances. Ces valeurs sont ensuite multipliées par un facteur pour convertir cette concentration molaire en concentration massique en µg/mL. Ensuite la masse de matière grasse initiale digérée (dans les 5mL des mélanges lait / fluide oral) est calculée. Grâce à cela, la masse d'acides gras libres libérée par masse de matière grasse initiale est obtenue

Des tests préliminaires ont été réalisés et ont permis de vérifier la compatibilité de ce kit avec les échantillons, ainsi que de déterminer la dilution optimale pour les dosages. La méthode a ensuite été adaptée au format microplaque en divisant proportionnellement tous les volumes. Cela permet d'économiser des réactifs mais aussi de gagner beaucoup de temps par rapport à la méthode en cuve.

4. Statistiques

Le logiciel utilisé pour l'étude statistique est « R » version 4.2.0

Des tests de normalité (test de Shapiro-Wilk) ont été effectués pour vérifier que les résultats suivent bien une loi normale, critère essentiel pour pouvoir appliquer une ANOVA. Dans le cas de nos résultats, ils suivent bien tous une loi normale.

Des ANOVA à deux facteurs sont faites pour vérifier la significativité des résultats. Les deux facteurs sont le type de fluide oral (salive et SSF) et le taux d'incorporation de fluide (V_{min} et V_{max}).

IV. Résultats et interprétations

1. Mesure de la taille des particules

Tout d'abord une analyse par le granulomètre est réalisée sur du lait entier seul ainsi que sur du lait entier acidifié à pH 3. Cela permet d'obtenir la distribution de taille des particules (en μm , de 0 à 2000 μm) exprimée en pourcentage du volume total des particules (figure 6).

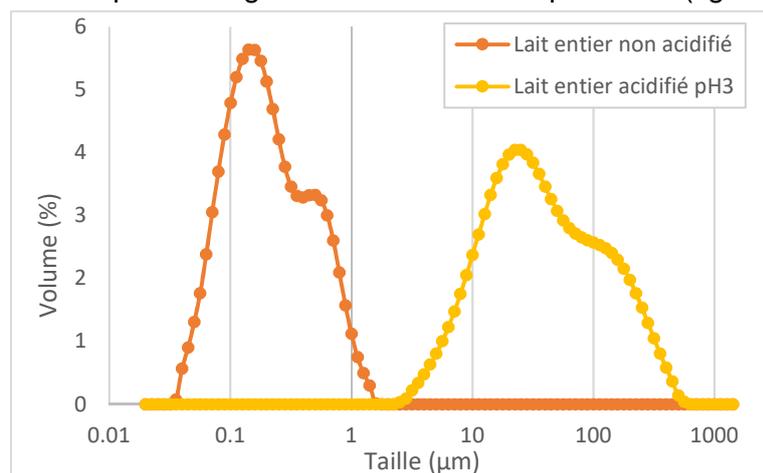
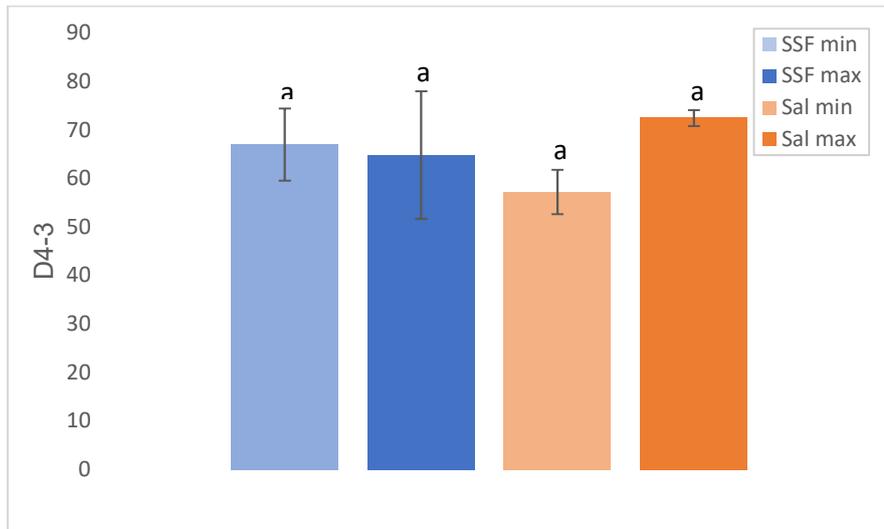


Figure 6 : Distribution de la taille des particules dans un lait entier et un lait entier à pH 3

Pour le lait entier non acidifié, on observe un pic suivi d'un épaulement. Le premier maximum correspond à des particules d'une taille de 0.18 μm . Cela correspond aux caséines qui se regroupent en micelles. Par exemple une taille moyenne de 0.15-0.20 μm a été reportée (Hristov et al., 2016). L'épaulement, quant à lui, correspond à des particules d'une taille de 0.56 μm ce qui pourrait être associé aux globules gras. Après l'acidification, les tailles des particules dans le lait augmentent en gardant cette même forme de pic avec épaulement. Cette augmentation de la taille des particules peut s'expliquer par les conditions de pH. En effet les caséines ont un point isoélectrique aux alentours de pH 4,6. A ce pH, les micelles se déshydratent, s'agrègent et précipitent. Quant le pH est abaissé au-delà, le point isoélectrique est dépassé : les micelles se resolubilisent partiellement mais demeurent sous forme d'agrégats de tailles supérieures (pic à 28 μm) aux micelles initiales.

Les chymes « Salive min », « Salive max », « SSF min » et « SSF max » sont analysés par le granulomètre de la même façon que le lait seul et acidifié mais en trois réplicats biologiques (échantillons préparés indépendamment). Après l'analyse, l'appareil calcule le ou les D4-3 pour chaque échantillon : le D4-3 correspond au diamètre moyen en volume d'un pic. Dans notre cas, tous les échantillons comportaient un seul pic.

Une moyenne des D4-3 obtenus est faite pour chaque chyme (figure 7). Les D4-3 variaient de 57 à 72 μ m.

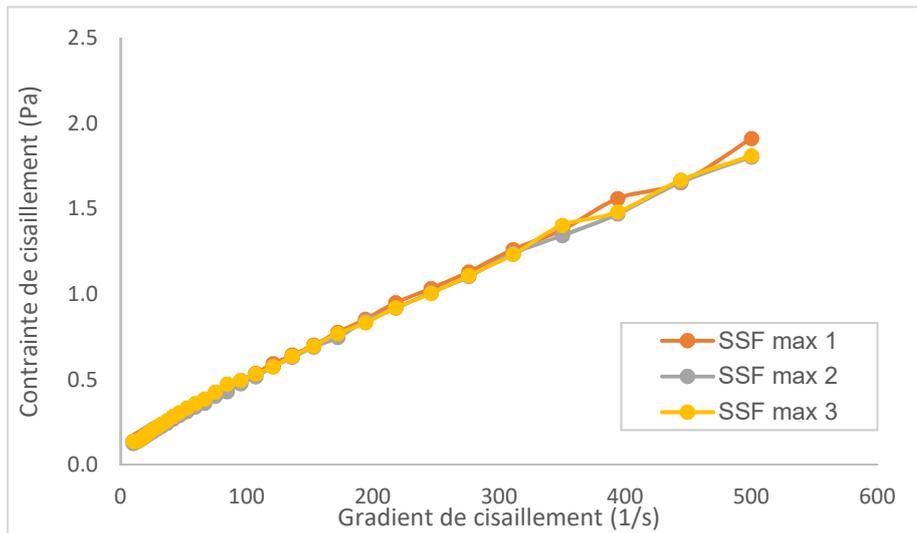


[Figure 7 : D4-3 moyens pour chaque chyme : lait entier mélangé avec des volumes de salive ou SSF variables \(min et max\)](#)

L'analyse statistique montre qu'il n'y a pas de différences significatives entre les mesures. Par conséquent, ni la salive, ni le taux d'incorporation de fluide (salive ou SSF) n'ont d'impact significatif sur la taille des particules dans le lait.

2. Mesures rhéologiques

On mesure la contrainte en fonction du gradient de cisaillement pour les différents chymes. La figure 8 présente les résultats pour les trois réplicats de l'échantillon SSF max. Il est observé que les points obtenus ne forment pas une droite parfaite.

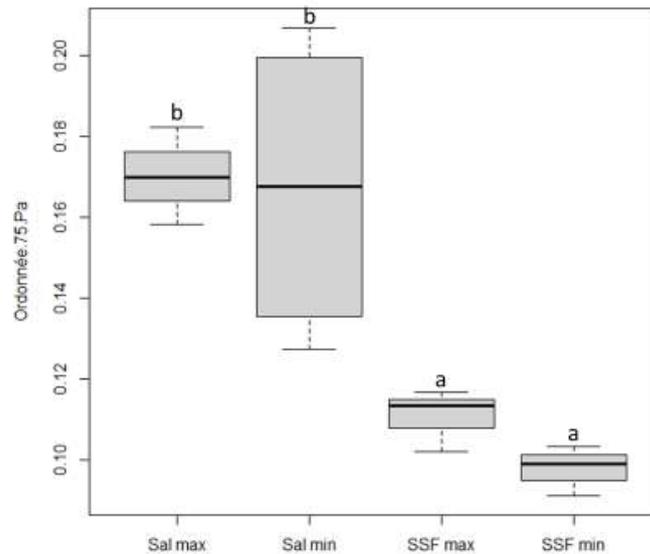


[Figure 8 : Contrainte en fonction du gradient de cisaillement de 10 à 500 s⁻¹ pour trois réplicats biologiques de lait entier avec un volume de SSF maximum](#)

Les valeurs suivent le modèle de Herschel-Bulkley ($y = y_0 + Kx^n$). Toutefois, pour des raisons de disponibilité d'un logiciel adapté, nous avons travaillé sur les valeurs de gradient de cisaillement jusqu'à 75s⁻¹, où on peut considérer que les données suivent un modèle linéaire (modèle de Bingham). Cette linéarité permet d'obtenir une courbe de régression qui fournit deux informations : l'ordonnée à l'origine et la pente. L'ordonnée à l'origine correspond au seuil. Un seuil correspond à la force qui doit être appliquée sur le produit pour qu'il s'écoule. Par exemple un produit qui a un seuil à 0.2Pa signifie que si la force appliquée à ce produit est inférieure à 0.2Pa alors il ne coulera pas. La pente quant à elle donne une indication sur la viscosité plastique du chyme. Par exemple un échantillon qui à une pente plus élevée qu'un autre présente une plus grande viscosité.

Une moyenne des seuils (figure 9) et des viscosités plastiques (figure 10) est effectuée pour les trois réplicats de chaque échantillon de chyme.

Pour tous les échantillons le seuil est faible (compris entre 0.10 et 0.17 Pa) car l'échantillon est très liquide. Néanmoins, il est observé que le seuil des chymes avec salive est plus élevé que les chymes avec SSF ($p < 0.001$). Cela signifie que la salive rend le mélange plus résistant à l'écoulement. Au contraire le facteur « taux d'incorporation de fluide » (min et max) n'a pas d'impact significatif sur le seuil du mélange.



[Figure 9 : Seuils moyens pour chaque chyme : lait entier mélangé avec des volumes de salive ou SSF variables \(min et max\)](#)

En ce qui concerne la viscosité plastique, tous les échantillons ont des valeurs très faibles. Le type de fluide oral a un impact significatif ($p=0.03$) sur cette propriété (figure 10). La viscosité est légèrement plus importante pour le SSF, globalement ou quand on observe les données par taux de fluide oral incorporé. Ces résultats sont surprenants car on s'attendait à avoir une pente plus élevée pour la salive étant donné son caractère « visqueux ». Une hypothèse est que dans le mélange certaines grosses particules créeraient ponctuellement des frottements dans l'entrefer, qui seraient réduits par les propriétés lubrifiantes de la salive. De plus il y a une plus grande variabilité des valeurs dans le cas de la salive que dans celui du SSF. Cela est cohérent avec l'utilisation d'un fluide biologique qui peut varier suivant le jour de l'analyse contrairement au SSF. Le facteur « taux d'incorporation de fluide » est significatif ($p=0.001$) : incorporer plus de fluide oral abaisse la valeur de la pente que ce soit dans le cas de la salive ou du SSF.

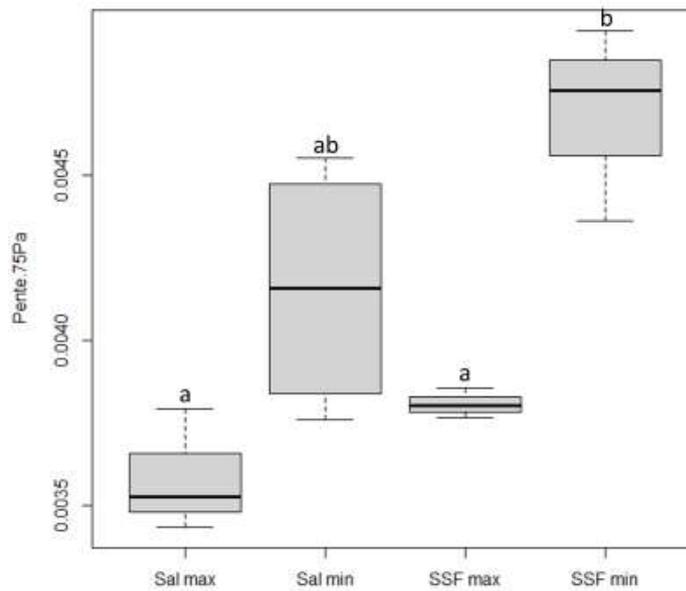


Figure 10 : Viscosités plastiques moyennes pour chaque chyme : lait entier mélangé avec des volumes de salive ou SSF variables (min et max)

3. Dosage des acides libres

Une moyenne des concentrations en acides gras libres ($\mu\text{g/g}$ de matière grasse initiale) est effectuée pour les trois réplicats de chaque échantillon de chyme (figure 11). On observe que les valeurs restent relativement stables pendant les 30 premières minutes puis augmentent de 30 à 60min, ce qui indique que l'activité lipolytique a bien eu lieu.

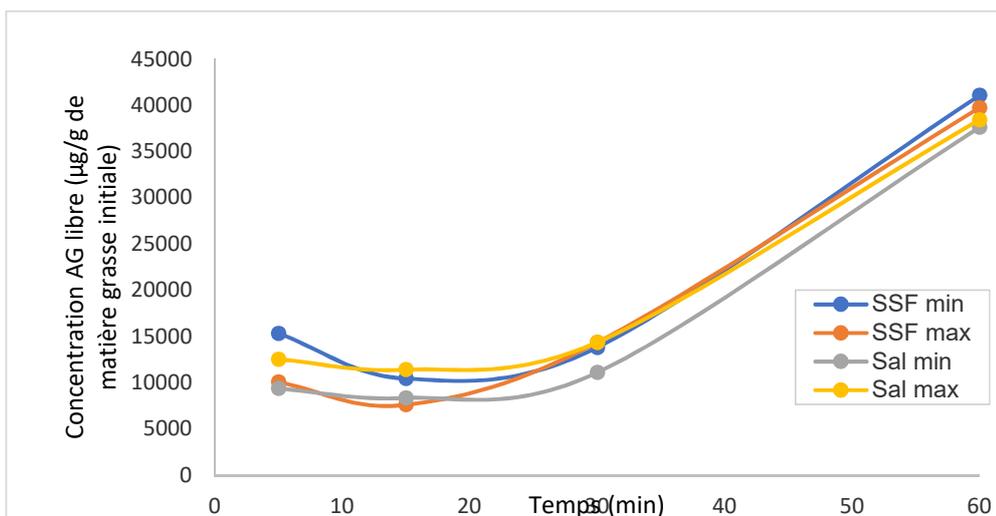


Figure 11 : Suivi de la lipolyse pendant la digestion pour chaque chyme : lait entier mélangé avec des volumes de salive ou SSF variables (min et max).

On peut signaler que la méthode de référence au laboratoire (dosage des AG par GC-MS) a été effectuée sur les mêmes échantillons par l'ingénieur responsable de la chromatographie, et que la cinétique et les ordres de grandeur étaient comparables.

Quel que soit le temps de prélèvement, ni le type de fluide oral, ni le taux d'incorporation de fluide n'ont d'effet significatif sur la lipolyse en digestion gastrique statique *in vitro*.

Discussion et perspectives

L'objectif de cette étude était de mettre en évidence des éventuelles interactions entre la salive et la dégradation de la matière grasse lors de la digestion gastrique chez l'homme. L'hypothèse de départ était que la salive étant un fluide visqueux, elle épaissit le chyme qui rend donc les interactions entre enzymes et substrats plus difficiles. Ceci aurait alors un impact dans la digestion des aliments ingérés. Pour étudier cette hypothèse nous avons dans un premier temps évalué si la salive modifiait les caractéristiques physiques du chyme. Pour cela, des mesures granulométriques et rhéologiques ont été faites. Ensuite les chymes ont été digérés *in vitro* et des dosages d'acides gras libres ont été effectués à différents temps de digestion, afin d'étudier le lien entre les propriétés du chyme et la lipolyse gastrique.

Nous avons pu constater que ni la salive, ni le taux d'incorporation de fluide (salive ou SSF) n'avaient d'impact significatif sur la taille des particules. Au contraire il a pu être mis en évidence que la salive modifie les propriétés rhéologiques des chymes : elle élève le seuil de l'échantillon mais réduit sa viscosité. Ce dernier résultat est inattendu. Il pourrait être dû à la présence dans le mélange de certaines grosses particules qui créeraient ponctuellement des frottements dans l'entrefer. La salive jouerait alors un rôle de lubrifiant et réduirait ces frottements. Pour vérifier cela des observations microscopiques à l'aide d'un microscope confocal seront faites prochainement (premiers résultats en Annexe 2). Les protéines et les lipides seront marquées par des fluorophores spécifiques qui feront alors apparaître les micelles de caséines et leurs agrégats, et les globules gras. Cela permettra d'évaluer si on observe de grosses particules qui peuvent interférer avec les mesures rhéologiques.

Nous avons aussi pu constater que le taux d'incorporation de fluide oral avait un impact sur la viscosité des chymes. Selon le protocole INFOGEST statique l'échantillon doit être dilué de moitié dans le SGF en phase gastrique. Dans notre cas l'échantillon était le mélange « lait plus fluide oral ». Cela signifie que lorsqu'on ajoutait plus de fluide oral, pour simuler des hauts flux salivaires, on ajoutait plus de SGF ce qui avait pour conséquence de diluer plus l'échantillon. Les résultats obtenus risquent donc de refléter davantage l'impact de la dilution globale que du seul taux d'incorporation de fluide oral. De nouvelles manipulations pourront donc être effectuées mais en conservant le même volume de SGF, basé sur le volume de lait.

Le but final de ce projet était d'étudier la lipolyse en phase gastrique en fonction du type et du taux de fluide oral. Nous avons constaté que les résultats des dosages d'acides gras étaient parfois très variables pour un même réplicat biologique c'est-à-dire qu'on avait une faible répétabilité analytique. Cela pourrait indiquer que les conditions du dosage n'étaient pas optimales. Celle-ci pourront être améliorées par exemple en allongeant le temps de réaction.

En conclusion, malgré les différences qui ont pu être observées lors des tests rhéologiques, aucune différence significative n'est mise en évidence pour la lipolyse digestive en phase gastrique. L'hypothèse de départ qui supposait que la salive épaississait le chyme et rendait les interactions entre enzymes et substrats plus difficile n'est donc pas confirmée.

Bilan personnel

Mon stage m'a permis de découvrir le secteur de la recherche en particulier dans l'agroalimentaire. Cela a pu confirmer mon envie de travailler dans ce secteur qui est pour moi source de réflexions, de découvertes et de motivation. Le travail avec les différents chercheurs est très stimulant et enrichissant. La sensation d'être utile est très présente au sein de ce laboratoire et contribue à maintenir une réelle motivation.

J'ai particulièrement aimé les phases de mise en place d'un nouveau protocole pour adapter une méthode de dosage en microplaque qui s'effectue normalement en cuve spectrophotométrique. Il y avait une réflexion à aborder pour résoudre les éventuels problèmes rencontrés et cela était très enrichissant.

Travailler pour le public a été pour moi bien plus motivant et valorisant que pour un laboratoire privé. Les objectifs se ressentent différemment. La connaissance et la découverte au profit de la science sont mis au cœur du travail, laissant la rentabilité au second plan.

Ce stage m'a satisfait en tout point. Je ne relève donc pas de points négatifs.

Il m'a permis d'améliorer grandement mon autonomie ainsi que la rigueur dans le travail accompli et dans mon organisation.

Liste des références

- Abrams CK, Hamosh M, Hubbard VS, Dutta SK, Hamosh P** (1984) Lingual lipase in cystic fibrosis. Quantitation of enzyme activity in the upper small intestine of patients with exocrine pancreatic insufficiency. *J Clin Invest* **73**: 374–382
- Brodkorb A, Egger L, Alminger M, Alvito P, Assunção R, Ballance S, Bohn T, Bourlieu-Lacanal C, Boutrou R, Carrière F, et al** (2019) INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat Protoc* **14**: 991–1014
- Hamosh M, Burns W** (1977) Lipolytic activity of human lingual glands (Ebner). *Lab Invest* **37**: 603–608
- Hristov P, Mitkov I, Sirakova D, Mehandgiiski I, Radoslavov G** (2016) Measurement of Casein Micelle Size in Raw Dairy Cattle Milk by Dynamic Light Scattering. *Milk Proteins - From Structure to Biological Properties and Health Aspects*. doi: 10.5772/62779
- Humphrey SP, Williamson RT** (2001) A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *The Journal of Prosthetic Dentistry* **85**: 162–169
- Hunt JN, Stubbs DF** (1975) The volume and energy content of meals as determinants of gastric emptying. *The Journal of Physiology* **245**: 209–225
- Smith LJ, Kaminsky S, D'Souza SW** (1986) Neonatal Fat Digestion and Lingual Lipase. *Acta Paediatrica* **75**: 913–918
- Vingerhoeds MH, Blijdenstein TBJ, Zoet FD, van Aken GA** (2005) Emulsion flocculation induced by saliva and mucin. *Food Hydrocolloids* **19**: 915–922

Annexes

Annexe 1. Protocole Assurance Qualité Recherche du dosage de l'activité pepsine.

 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf	MODE OPERATOIRE	 UMR 1253 INRA-AGROCAMPUS OUEST
Code:	Indice de révision :	Date de mise en service :
Mesure de l'activité de la pepsine		
Mots-clés : pepsine – activité enzymatique		

Principe: Détermination des peptides solubles dans le TCA libérés suite à l'hydrolyse par la pepsine de l'hémoglobine et détectés par spectrophotométrie à 280 nm (pH 2, 37 ° C)



Définition de l'unité: Une unité produira un ΔA_{280} de 0,001 par minute à pH 2,0 et 37° C, mesurée par la formation des produits solubles dans le TCA

Conditions: T = 37°C, pH = 2.0, A_{280} , Epaisseur de la cuve = 1 cm

Références: Adapté de Anson et al.; 1938

Anson et al ; THE ESTIMATION OF PEPSIN, TRYPSIN, PAPAIN, AND CATHEPSIN WITH HEMOGLOBIN, The Journal of General Physiology, 1938

Réactifs:

- Pepsine porcine (Sigma-Aldrich, P6887)
- Hémoglobine bovine (Sigma-Aldrich, H2500)
- Acide chlorhydrique
- NaCl
- Tris-HCl (Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane)
- Trichloro acide acétique 99,5%

Solutions:

- HCl 10 mM
- HCl 300 mM
- Tampon Tris HCL10mM +NaCl 150mM ajusté à pH=6.5 avec HCl 1M
- Solution d'acide trichloracétique (TCA) à 5%:
- Substrat: hémoglobine à 2% (p / v)
 - Peser 0,5 g de poudre d'hémoglobine et la dissoudre dans 20 ml d'eau purifiée.
 - Ajuster à pH = 2 avec de l'HCl 300mM et compléter à 25ml avec de l'eau MilliQ (si nécessaire).
- Gamme Pepsine porcine (enzyme): **5-30 µg / mL**
 - **à préparer au dernier moment**, une solution mère à 1 mg / mL de pepsine: Peser la pepsine et la diluer dans un tampon Tris-HCL10mM+ NaCl à 150 mM ajusté à pH = 6,5 (Solution mère)
 - Diluer au 1/10 la solution mère de pepsine afin d'obtenir une solution de pepsine à 100 µg / mL (dilution dans le tampon à pH=6.5):
 - Conserver la solution de pepsine sur glace.
 - Juste avant l'essai, diluer l'enzyme à 5, 10, 15, 20, 25 et 35 µg / mL dans de l'HCl à 10 mM (HCl10mM=) pH=2 pour être au même pH que le substrat et faire l'hydrolyse à pH=2), comme indiqué dans le tableau ci-dessous

[Pepsine] µg / mL	10	15	20	25	30	35
HCl 10mM (µL)	900	850	800	750	700	650
Pepsine 0.1 mg/mL (µL)	100	150	200	250	300	350

- garder la gamme d'enzyme sous glace jusqu'à l'essai.

Équipement:

- Microcentrifugeuse
- Spectrophotomètre UV (280nm)
- pH mètre
- bain marie à 37 ° C
- thermomètre

Matériaux:

- Cuves en quartz 1ml (épaisseur= 1 cm)
- Tubes Eppendorf (2 ml)
- Micropipettes
- Chronomètre

Procédure:

- 1- Régler la longueur d'onde du spectrophotomètre à 280 nm (température ambiante)

- 2- Préparer des tubes eppendorff de 2 mL pour chaque concentration enzymatique à tester et les blancs (faire 2 blancs). Il est conseillé de réaliser en duplicata 1 ou 2 points de la gamme (répétabilité manip/opérateur)
- 3- Pipeter 500 µl de la solution d'hémoglobine dans chaque tube, y compris le blanc.
- 4- Incuber les tubes à 37°C pendant environ 3-4 minutes afin d'atteindre l'équilibre de température. (faire un tube test température avec 500µl d'Hémoglobine,)
- 5- Ajouter 100 µL de pepsine des différentes concentrations dans le tube correspondant et laisser incuber pendant exactement 10 minutes.
Suggestion : pour garantir 10 minutes pour chaque tube, laisser 30s entre chaque tube
- 6- Arrêter la réaction en ajoutant 1 mL de TCA à 5% à chaque tube (les blancs inclus).
- 7- Pour les blancs : après ajout de TCA , ajouter 100 µL de sol pepsine (prendre la sol en pepsine la + concentrée (35µg/ml))
- 8- Centrifuger tous les tubes à 6000 g pendant 30 minutes à température ambiante pour précipiter l'hémoglobine (à température ambiante).
Pour la lecture de l'absorbance à 280nm=) utiliser des cuves en quartz (1ml)
- 9- Faire l'autozéro avec les 2 blancs
=) vérifier tout de même l'absorbance du blanc et la noter avant de faire l'autozéro sur le spectro (normalement valeur très proche de zéro)
- 10- Pipeter le surnageant (soluble clair) et lire l'absorbance à 280 des différentes concentrations en pepsine testées.
Rq : L'absorbance doit être <1, si supérieure : la concentration en pepsine du test est trop élevée

Calculs:

Vérifier que l'activité obtenue est la même pour chaque concentration testée de pepsine pour s'assurer d'être dans la partie linéaire de l'évolution de la concentration en pepsine.

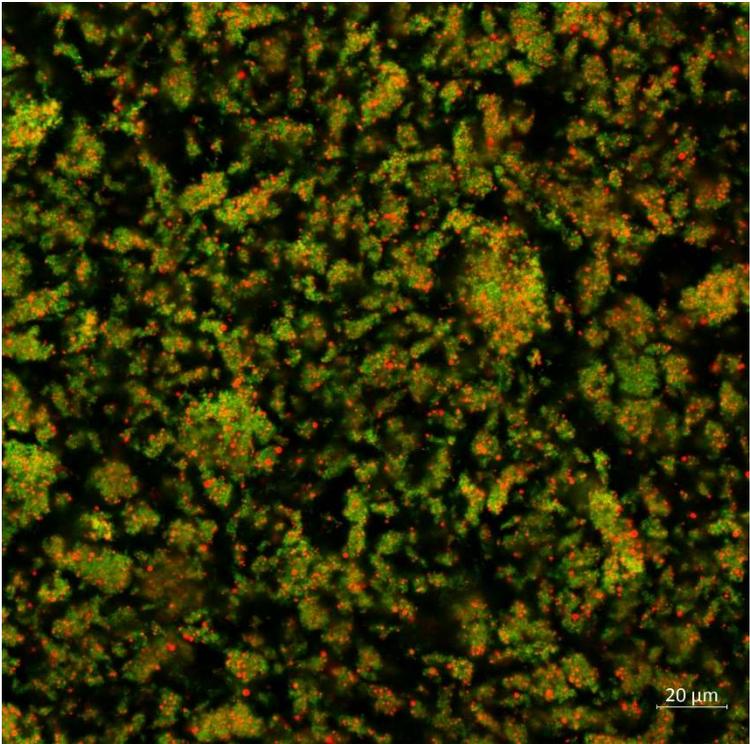
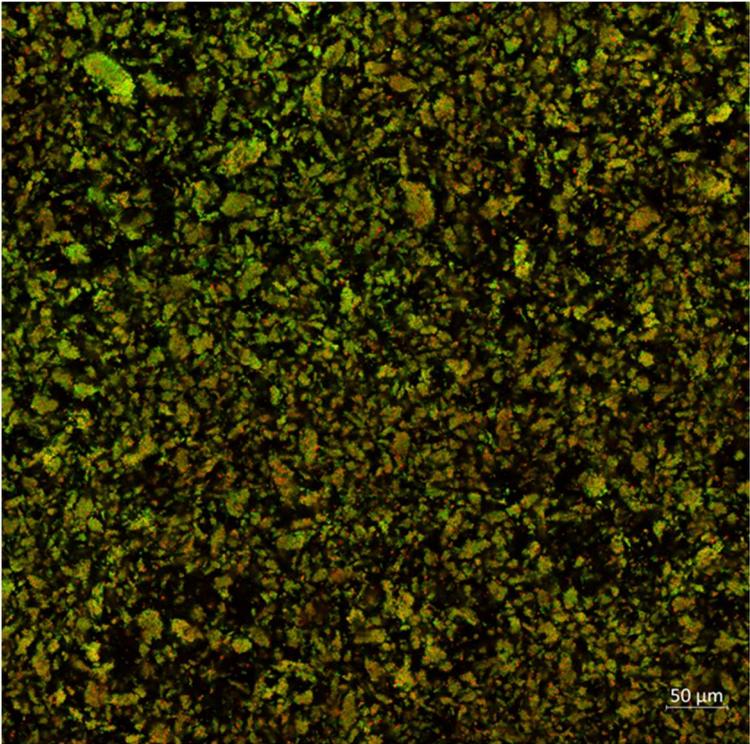
$$\text{Units/mg} = \frac{[A_{280} \text{ Test} - A_{280} \text{ Blank}] \times 1000}{(\Delta t \times X)}$$

Δt : Durée de la réaction :10 minutes

X: Concentration de la solution de pepsine testée (mg/ml)

Rédaction: Lucie Lorieau	Vérification : Olivia Menard	Approbation et Mise en service :
Date : 02/03/2017 Visa	Date : 06/06/2017 Visa	Date Visa

Annexe 2. Premiers essais de caractérisation de la structure des chymes par microscopie confocale (en rouge : marquage des lipides au Red Nile, en vert : marquage des protéines au Fast Green) pour un échantillon Sal min.



Résumé / Abstract

Français :

Lors de la consommation de lait, celui est mélangé avec la salive en bouche, et le mélange se poursuit dans l'estomac pendant la digestion gastrique. L'objectif de cette étude était de déterminer si la salive pouvait influencer la dégradation de la matière grasse lors de la digestion gastrique chez l'humain. L'hypothèse de départ était que la salive étant un fluide visqueux, elle épaissirait le chyme ce qui rendrait les interactions entre enzymes et substrats plus difficiles.

Pour étudier cette hypothèse nous avons dans un premier temps évalué si la salive modifiait les caractéristiques physiques du chyme par des mesures granulométriques et rhéologiques (test d'écoulement). Ensuite les chymes ont été digérés *in vitro* suivant le protocole statique INFOGEST et des dosages d'acides gras libres ont été effectués à différents temps de digestion, afin d'étudier le lien entre les propriétés du chyme et la lipolyse gastrique.

Ce rapport montre que la salive a un impact sur la rhéologie du chyme en élevant le seuil d'écoulement mais également en abaissant sa viscosité. Toutefois, ces différences rhéologiques n'ont pas d'impact sur la digestion de la matière grasse car aucune différence significative n'a été mise en évidence entre des chymes préparés avec de la salive humaine ou du fluide salivaire synthétique.

English :

During milk ingestion, milk is mixed in the mouth with saliva, and saliva is further incorporated in the stomach into the chyme. The objective of the study was to determine if saliva influences lipolysis during gastric digestion in humans. The hypothesis was that saliva could increase the consistency of the chyme, which would impair the enzymes-substrates interactions.

In order to test this hypothesis, we first evaluated if saliva modified the physical properties of the chymes by granulometry and rheology (flow test). Second, chymes were digested using the INFOGEST *in vitro* static model and non-esterified fatty acids were measured in samples at different times of digestion, in order to study the link between the physical properties of the chymes and lipolysis.

Results show that saliva has a significant impact on chyme rheology, by increasing the yield stress and decreasing viscosity. However, those properties do not affect lipolysis since no difference was observed in free fatty acid levels between chymes prepared with human saliva or simulated salivary fluid.