HAL
open science

Evolutions structurales et oxydation des lipides lors de la digestion in vitro d'émulsions modèles

Hernan Kenmogne Domguia

To cite this version:

Hernan Kenmogne Domguia. Evolutions structurales et oxydation des lipides lors de la digestion in vitro d'émulsions modèles. Ingénierie des aliments. Ecole Nationale Vétérinaire Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique, 2012. Français. NNT : . tel-02810074

HAL Id: tel-02810074

https://hal.inrae.fr/tel-02810074v1

Submitted on 6 Jun 2020

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

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

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE, AGROALIMENTAIRE ET DE L'ALIMENTATION NANTES ATLANTIQUE (ONIRIS)

ÉCOLE DOCTORALE 495
Végétal, Environnement, Nutrition, Agroalimentaire, Mer

ÉVOLUTIONS STRUCTURALES ET OXYDATION DES LIPIDES LORS DE LA DIGESTION *IN VITRO* D'ÉMULSIONS MODÈLES

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biotechnologies Agroalimentaires, Sciences de l'Aliment
Spécialité : Biochimie et Nutrition

Présentée et soutenue publiquement par

Hernan Brice KENMOGNE DOMGUIA

Le 18 décembre 2012 devant le jury ci-dessous

Rapporteurs : M. Gilles FERON, Chargé de Recherche, INRA de Dijon
Mme Odile SERGENT, Professeur, Université de Rennes
Membres du jury : M. Didier DUPONT, Directeur de Recherche, INRA/Agrocampus Ouest, Rennes
M. Elie FOKOU, *Associate Professor*, Université de Yaoundé I-Cameroun
Mme Marie De LAMBALLERIE, Professeur, GEPEA/Oniris, Nantes

Directrice de thèse : Mme Claude GENOT, Directrice de Recherche, INRA de Nantes
Co Directeur : Mme Anne MEYNIER, Chargée de Recherche, INRA de Nantes

DÉDICACE

Je dédie ce travail à feu ma très chère maman, Nwoguia Pola Rebecca (Joséphine). Je suis très content de m'être enfin acquité de la promesse que je t'avais faite. Malgrè ton absence physique, tu m'as toujours accompagné et je tire de cette certitude la force dont j'ai besoin pour avancer chaque jour dans la vie.

REMERCIEMENTS

Ce passionant travail a été réalisé à l'INRA de Nantes au sein de l'équipe Interfaces et Systèmes Dispersés (ISD) de l'Unité de Recherche Biopolymères, Interactions et Assemblages (BIA UR 1268) sous la Direction de Madame Claude Genot et la co-direction de Madame Anne Meynier.

Je tiens tout particulièrement à remercier mes encadrantes de thèse qui ont du me subir pendant presque quatre ans et qui m'ont transmis le sens de la rigueur et de la critique scientifique, la prise d'initiative et de la gestion de projet, tout ça dans un cadre très convivial. Cela a a été un vrai plaisir de travailler avec vous pendant ces 4 ans, d'abord en stage de M2 puis en thèse. Pour ma part, vous constituez à toutes deux l'encadrant idéal pour un thésard.

Je tiens également à remercier les membres de mon jury de thèse, pour avoir donné de leur temps lors de l'exercise de ma soutenance et/ou les phases antérieures de sa préparation. Je remercie ainsi Mme Odile Sergent et M. Gilles Feron pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse, Mme Marie De Lamballerie et MM. Elie Fokou et Didier Dupont pour avoir accepté d'être membres de mon jury.

Aux membres de mon comité de suivi de thèse, M. Frank Boury, Mme Marie-Caroline Michalski et Mme Martine Armand, je dis merci pour avoir suivi l'évolution de ma thèse pendant ses trois années. Merci également pour tous les conseils scientifiques et pour toutes les suggestions qui sont ressortis des comités annuels et qui nous ont fait évoluer, du point de vue scientifique, autant ma thèse que moi.

Je remercie MM. Jean-François Thibault et Henri Seegers, présidents successifs du centre INRA Angers-Nantes au cours de ma thèse, M. Jacques Guéguen, directeur de l'unité Biopolymères, Interactions et Assemblages (BIA), et M. Marc Anton, responsable de l'équipe Interfaces et Systèmes Dispersés (ISD), de m'avoir accueilli au sein du laboratoire. Un merci particulier à Marc Anton pour les conseils et les discussions au sujet de ma préparation de l'après thèse.

Un grand merci à Michèle Viau, à qui j'ai essayé de prélever autant que je pouvais de connaissances techniques en GC-MS et HPLC. Merci Michèle pour la formation à ces techniques, l'aide et les conseils prodigués toujours dans la bonne humeur lors du dosage des classes lipidiques et la quantification des HAs qui nous a tant fait suer.

A mes collègues de bureau : Tin-Hinan Kabri, avec qui j'ai partagé le plus gros de mes déboires pendant les 2 ans passées en face de moi, merci pour ton soutien inconditionnel ; Dominique Guibert pour ta bonne humeur, la disponibilité que tu as manifesté à mon égard

lorsque mon PC et mes documents voulaient me faire m'arracher les cheveux et la convivialité que tu as toujours entretenu dans le bureau, je te dis merci. Ce serait un sacrilège de ne pas parler de notre pause de quatre heures. Je crois effectivement qu'elle va énormement me manquer avec toutes les blagues farfelues, mais au moins elle aura rempli sa fonction principale : me permettre de tenir jusqu'au bout.

Merci Lucie Ribourg, pour ta disponibilité et l'aide que tu m'as apportée lors des dosages des tocophérols et du malondialdehyde. Merci également pour la sympathie que tu m'as toujours témoigné et pour ta bonne humeur qui ont chaque fois rendu agréable de travailler avec toi.

Merci à Alain Riaublanc pour l'aide précieuse et les conseils qui m'ont été d'une grande aide dans mes essais en microscopie confocale et pour l'interpretation de mes résultats granulométriques.

Je tiens également à remercier Christophe Soulage, Manar Awada et Marie-Caroline Michalski qui au cours de l'expérimentation chez la souris, ont réalisé le gavage et la collecte des prélèvements.

Merci à Yvan Choiset et Isabelle Serventon pour m'avoir initié à l'évaluation de la protéolyse par électrophorèse.

Merci à Veronique Ferchaud pour avoir bien voulu m'accueillir dans son laboratoire et à Audrey Aguesse pour avoir pris sur son temps pour me former au dosage des acides biliaires.

Merci à Geneviève Llamas pour sa sympathie et pour m'avoir initié à la DLS.

Je tient également à remercier Pauline Videcoq. Pour toutes les fois où tu as souffert le martyre en t'empéchant de rire lorsque, tel Gargantua je m'aplatissais sur la glace traumatisante pour les fessiers, de la patinoire. Pour ça, les bons moments passés en ta compagnie et pour l'ouverture que tu manifestes envers ceux qui sont différents, merci.

A Chloé Boulanger stagiaire dont j'ai participé à l'encadrement et Stéphanie Moisan Ingénieur avec qui j'ai beaucoup travaillé au cours de son stage ingénieur et à qui j'ai apris et transmit les rudiments du vortex, je dis merci. J'aurais essayé tant bien que mal de vous faire accepter l'hypothèse de vivre l'expérience très intéressante, somme toute pas toujours facile, qu'est la thèse.

A Bérénice Houinsou-Houssou, mon ange gardien toujours souriante qui n'a pas defailli à la tâche qui lui incombait pendant mes 3 années de thèse je dis un grand merci.

A Sylvaine Bizon que j'ai embêté tant de fois, je dis merci pour ta patience et la disponibilité dont tu as toujours fait preuve.

Pendant les trois passionnantes années de thèse au sein de l'équipe ISD j'ai profité volontairement ou non de tous les membres de l'équipe. Merci à Sebastien Marze pour toutes nos

discussion scientifiques, à Elisabeth David-Briand pour tous les conseils de sécurité, Valérie Beaumal pour les commandes de consommables et des conseils méthodologiques, Michel Audrebrand, Patricia LeBail pour leur bonne humeur et leur sympathie, Marie-Helène Ropers qui n'a souvent pas refusé de s'arrêter en chemin pour me raccourcir le chemin, Veronique Solé, Bruno Novales et Catherine Garnier, Marlène Dupuy, Chantal Eliseeff, et Catherine Blot, merci pour tout.

Je tiens également à remercier tous les stagiaires, CDD, doctorants, ex-doctorants de l'équipe ISD que j'ai connu au cours de ma thèse, Guéba Agoda qui m'a toujours été de bon conseil, Anne-Laure Fameau, Claire Berton, Mathieu Delample, Tin-Hinan Kabri, Claire Surel, Sandrine Tchoa Kwetcha, Jean-Marc Schwartz, Floriane Gouin, Pierre Brestaz, ma disciple Delphine Bontenps, Maëla Choimet, Luma Worsch, Amine El Orche, Gaetan Despres.

Au Pr. Kansci qui m'a toujours soutenu, conseillé et encouragé depuis mon arrivée en France, ainsi qu'à toute sa famille, je tiens à exprimer mes remerciements.

Merci à mes ami(e)s particulièrement Julie Mekoue, Sylestre Yamthieu, Gaëlle Fameni, Sandrine Tchoa, Yvane Aubry, Adamou Boubacar, Thierry Mbida, pour leur écoute, leurs encouragements et leur soutien inconditionnel ; aux familles Kemdjo (Guy-Bertrand, Valentine, les enfants et maman Cécile), Kamani (Esther, Hervé et les enfants) et Kouam (Sylvain et Nadège et les enfants), merci pour votre soutien. A Alain Guedier et à tous les membres du groupe des étudiants et jeunes professionels de Ste Catherine du Petit-Port, merci pour votre soutien et vos encoragements.

Merci également aux membres de l'association USA (Union pour la Solidarité Active) et aux bénévoles de l'ASEF (Association pour la Solidarité Étudiante en France) pour la fraternité et la convivialité que j'y ai trouvé pendant toutes ces années.

A mes parents, Philippe et Philomène Domguia, merci pour le soutien moral et affectif que vous m'avez toujours donné. A mes grands parents, oncles et tantes, frères et sœurs, cousins et cousines, neuveux et nièces, particulièrement ma grande sœur Eliane Kouam son mari Christian Siani et sa famille pour le soutien inconditionnel pendant ces dernières 4 années, merci.

Je ne saurais ne pas évoquer le soutien que m'ont témoigné les membres de l'équipe Interfaces et Systèmes Dispersés pendant ma maladie qui a mis en pause ma thèse pour deux mois. A cet effet, je tiens à remercier particulierement Claude, Anne, Tin-Hinan, Dominique, Michèle, Généviève, Lucie, Bérénice, Sandrine, Claire, Anne-Laure et Pierre.

AVANT-PROPOS

L'Institut National de la Recherche Agronomique est le premier institut français et européen en recherche agronomique et occupe le deuxième rang mondial dans ce domaine. Les enjeux abordés par celui-ci tournent autour de l'agriculture, l'alimentation et les cultures alimentaires, la nutrition humaine, l'environnement et l'épuisement des ressources fossiles, ainsi que la gestion et la valorisation des territoires. Ma thèse s'inscrit dans l'une des priorités thématiques de cet institut qui est de mieux connaître les transitions alimentaires et leurs effets en relations avec l'alimentation, la santé et la nutrition.

L'étude de la relation qui existe entre l'alimentation au sens large et la prévalence de certaines pathologies dans certains groupes de populations a conduit à la découverte de l'importance des acides gras polyinsaturés n-3 (oméga 3) longues chaînes (AGPI n-3 LC). Depuis quelques années, la mise sur le marché d'aliments enrichis naturellement ou par supplémentation en de nombreux nutriments dont les acides gras polyinsaturés n-3 est en augmentation. Si certains effets bénéfiques pour la santé d'une augmentation des apports en ces nutriments sont, à ce jour, incontestables, les effets en conditions digestives, d'une alimentation enrichie en AGPI n-3 LC, sur la formation de leurs produits d'oxydation dans le tractus gastro-intestinal suscitent un questionnement dans la communauté scientifique. L'unité Biopolymères, Interactions et Assemblage (BIA) de l'INRA Angers-Nantes, et spécifiquement l'équipe Interfaces et Systèmes Dispersés (ISD) s'intéresse, entre autres, au devenir des acides gras n-3 après leur ingestion. Ce questionnement a contribué à la conception et la conduite, dans cette équipe et en collaboration avec l'unité mixte de recherche (UMR) CarMen (Lyon), l'ENSAIA (LiBio, Nancy), l'IPBR (Lyon) et Polaris (Pleuven), du programme ANR AGEcaninox (ANR-08-ALIA-002). Ce programme avait pour objectif de quantifier les marqueurs de l'oxydation des lipides tout au long de l'élaboration, des vecteurs, mais aussi lors de la digestion. Les conséquences métaboliques de leur absorption ont été étudiées sur modèles cellulaire et animal. L'acceptabilité des produits formulés enrichis a été envisagée chez les séniors.

Le travail présenté ici, qui s'inscrivait dans le programme AGEcaninox, se propose d'améliorer les connaissances en ce qui concerne le risque sanitaire potentiel dû au devenir oxydatif, dans le tractus gastro-intestinal, des acides gras n-3 contenus dans les aliments enrichis. Ce manuscrit est en partie constitué de publications et de projets de publications rédigés en anglais, ainsi que de résultats additionnels et d'une mise en perspective rédigée en français. Au sein de chaque article, une numérotation indépendante est utilisée pour les titres, figures et tableaux.

La mise en place de cette thèse a été rendue possible par les financements conjoints de l'INRA et des Pays de la Loire d'une part et du projet ANR AGEcaninox d'autre part, qui ont permis de pourvoir à ma rémunération et aux frais de fonctionnements de ce projet de trois ans. Je tiens à leur adresser mes remerciements pour l'opportunité qu'ils m'ont ainsi donnée de me spécialiser dans ce champ de recherche passionant et novateur.

LISTE DES PUBLICATIONS

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont été valorisés au moyen de rédaction d'articles, de chapitre d'ouvrage et de communications, orale et sous forme de poster, à de nombreux congrès et colloques.

Articles à comité de lecture

Kenmogne-Domguia H.B., Meynier A., Viau M., Llamas G., Genot C. (2012). Gastric conditions control both the evolution of the organization of protein-stabilized emulsions and the kinetic of lipolysis during in vitro digestion. *Food & Function*, **3**(12): 1302-1309.

Kenmogne-Domguia H.B., Meynier A., Boulanger C., Genot C. (2012). Lipid oxidation in food emulsion under gastrointestinal simulated conditions: key role of endogenous tocopherols and initiator. *Food Digestion*, **3**(1-3): 46-52.

H.B. Kenmogne-Domguia., Moisan S., Viau M., Genot C., Meynier A.. Kinetics of lipid oxidation during the in vitro digestion of emulsions containing long chain n-3 fatty acids depend on the initial organization of the emulsions and the composition of the digestive media. (en préparation pour soumission à *Food Chemistry*)

Genot C., **Domguia-Kenmogne H.B.**, Michalski M.C., Awada M., Meynier A.. Oxidative Fate of Lipid Structures in Food and During Digestion – Possible Metabolic Significance. (en preparation pour soumission à *Molecular Nutrition & Food Research*)

Chapitre d'ouvrage

Meynier, A., Michalski, M. C., Marze, S., **Kenmogne-Domguia, H. B.**, Awada, M., & Genot, C. (sous presse). Devenir digestif et effets métaboliques des matrices formulées à base de lipides. *In* A. Fardet, I. Souchon & D. Dupont (Eds.), Rôle de la structure physique des produits alimentaires sur leur devenir digestif et les effets métaboliques et nutritionnels associés). Paris: QUAE

Proceedings

Genot C., **Domguia-Kenmogne H.B.**, Michalski M.C., Awada M., Meynier A., 2011. Oxidative Fate of Lipid Structures in Food and During Digestion – Possible Metabolic Significance. proceedings of VI CIGR. Nantes France, 1-6. Sur CD-Rom.

Congrès internationaux

Communication orales

Kenmogne-Domguia, H.B., Meynier, A., Genot, C. Fate of protein-stabilized oil-in-water emulsions under gastrointestinal simulated conditions: evolution of molecular and supramolecular lipid structure. 102nd AOCS Annual Meeting & Expo, Cincinnati, May 2011.

Posters

A. Meynier *, **H.B. Kenmogne-Domguia**, C. Boulanger, C. Genot. Lipid oxidation in food emulsion under gastrointestinal simulated conditions: key role of endogenous tocopherols and presence of initiator. First Int. Cong. Food Digestion, COST Action Infogest, Cesena , March 2012.

Congrès et colloques nationaux

Communication orales

Kenmogne-Domguia, H.B., Meynier, A., Genot, C. Réactivité des acides gras insaturés au cours du processus de digestion *in vitro* : modifications structurales de matrices modèles et conséquences sur la formation de marqueurs biologiques du stress oxydant. Séminaire Modaltube, Paris, septembre 2010.

Kenmogne-Domguia, H.B. Réactivité des acides gras insaturés au cours du processus de digestion *in vitro* : modifications structurales de matrices modèles et conséquences sur la formation de marqueurs biologiques du stress oxydant. Réunion AGEcaninox, Lyon, juin 2011.

Kenmogne-Domguia, H.B. Réactivité des acides gras insaturés au cours du processus de digestion *in vitro* : modifications structurales de matrices modèles et conséquences sur la formation de marqueurs biologiques du stress oxydant. Animation scientifique ISD, Nantes, septembre 2011.

Kenmogne-Domguia, H.B., Meynier, A., Genot, C. Les conditions gastriques modulent l'évolution colloïdale d'émulsions stabilisées par les protéines et leur cinétique de lipolyse au cours de la digestion simulée. 1ères journées scientifiques ED VENAM, Angers, octobre 2011.

Posters

H.B. Kenmogne-Domguia, A. Meynier, C. Genot. Fate of oil-in-water emulsion under gastric simulated conditions. Effect of gastric pH and pepsin. Colloque Biopolymères, Le Croisic, septembre 2010.

Kenmogne-Domguia, H.B., Meynier, A., Genot, C. Gastric conditions modify both the evolution of the organization of protein-stabilized emulsions and the kinetic of lipolysis. Journée Jeunes Chercheurs BIA, Nantes, juin, 21, 2011

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AG	:	acides gras
AGI	:	acides gras insaturés
AGL	:	acides gras libres
AGMI	:	acides gras mono-insaturés
AGPI	:	acides gras polyinsaturés
AGPI LC	:	acides gras polyinsaturés à longue chaîne
AGS	:	acides gras saturés
ALA	:	*α-linolenic acid* = acide α-linolénique: 18:3 n-3
CMC	:	Concentration Micellaire Critique
DAG	:	diacylglycérol
DHA	:	*docosahexaenoic acid* = acide docosahexaénoique: 22: 6 n-3
E/H	:	émulsion eau dans huile
EPA	:	*eicosapentaenoic acid* = acide eicosapentaénoique: 20: 5 n-3
HAs	:	hydroxyalcénals
HHE	:	*trans*-4-hydroxy-2-hexénal
HNE	:	*trans*-4-hydroxy-2-nonénal
HPX	:	hydroperoxydes
LA	:	*linoleic acid* = acide linoléique: 18:2 n-6
MAG	:	monoacylglycérol
MDA	:	malondialdéhyde = malonaldéhyde
PC	:	phosphatidylcholine
PLA_2	:	phospholipase A_2
PLRP	:	*pancreatic lipase-related protein*
SAB	:	sérum albumine bovine
SDS	:	sodium dodécyl sulfate
TAG	:	triacylglycérol
TBA	:	acide thiobarbiturique
TGI	:	tractus gastro-intestinal
UHPLC	:	*ultra-high performance liquid chromatography*
γ-LA	:	*γ-linolenic acid* = acide γ-linolénique: 18:3 n-6

LISTE DES FIGURES (HORS ARTICLES)

Figure 1 : Structure chimique des principaux acides gras poly-insaturés

Figure 2 : Représentation schématique d'une molécule de triacylglycérol

Figure 3 : Structures des principaux phospholipides

Figure 4 : Structure chimique des principaux sels biliaires

Figure 5 : Organisation des structures supramoléculaires des sels biliaires (Mukhopadhyay and Maitra, 2004)

Figure 6 : Anatomie du système digestif (Marieb, 1999)

Figure 7 : Complexe lipase pancréatique–colipase–micelle

Figure 8 : Structure chimique du malondialdéhyde, du 4-hydroxy-2-hexénal et du 4-hydroxy-2-nonénal

Figure 9 : Formation des hydroxyalcénals (A) et du MDA (B)

Figure 10 : Réactions impliquant les Oα,βUAs et des résidus acides aminés. A : formation de base de Schiff entre les résidus lysyl et le 4-HHE. B : addition de Michaël entre le 4-HHE et un résidu lysyl. C : addition d'un 4-HHE sur un résidu histydyl

Figure 11 : Représentation schématique de la démarche expérimentale utilisée au cours de l'évaluation des évolutions coloidale et de la lipolyse

Figure 12 : Représentation schématique de la démarche expérimentale utilisée au cours de l'évaluation de l'oxydation des lipides au cours de la digestion *in vitro* et chez les souris

Figure 13 : Représentation schématique du protocole digestif gastro-intestinal utilisé

Figure 14 : Variation de pH des milieux digestifs au cours du protocole expérimental

Figure 15 : Protocole de caractérisation de la méthode d'extraction hexane-isopropanol

Figure 16 : Rendements d'extraction, gravimétrique (noir) et par étalonnage interne à la trimargarine (gris), des lipides des émulsions obtenus par la méthode hexane-isopropanol. (n=3)

Figure 17 : Profils chromatographiques obtenus après analyse par HPLC-DDL des échantillons de lipides extraits des émulsions (A) et des milieux gastriques (B) ou intestinaux (C) après une heure et 5 heures d'incubation respectivement

Figure 18 : Courbes étalons des TAG (noir), DAG (vert), MAG (bleu) et AGL (rouge) tracées pour des quantités injectées comprises de 0,1 à 3 (1ère colonne), 5 (2ième colonne) ou 6 µg (3ième colonne) suivant les modèles polynomiaux d'ordres 2 (A), 3 (B) ou 4 (C)

Figure 19 : Courbes moyennes avec plage d'écarts-types des courbes étalons des TAG (A), DAG (B), MAG (C) et AGL (D)

Figure 20 : Courbes étalon utilisées pour la quantification des classes lipidiques lors du suivi de la lipolyse

Figure 21 : Distributions en volume (A) et en surface (B) de milieux gastriques non dilués (A et B) et dilués (A' et B') dans du SDS : (▬) émulsion native ou (▬) milieu gastrique avant incubation et (▬) après 1 heure d'incubation

Figure 22 : Distributions en volume (A) et en surface (B) de milieux intestinaux non dilués (A et B) et dilués (A' et B') dans du SDS : (▬) milieu intestinal avant incubation et (▬) après 2 heures d'incubation

Figure 23 : Profils SDS-PAGE de solution native de SAB, de l'émulsion et des milieux gastriques contenant (A) ou pas (B) la pepsine et ce, avant (G0) et après une heure d'incubation (G1)

Figure 24 : Photographies sans dilution (A) ou après dilution (B) dans le SDS 1%, des milieux intestinaux avant incubation (I0) ou après 2 heures d'incubation (I2) en fonction du pH des échantillons issus des milieux gastriques contenant la pepsine

Figure 25 : Distributions en taille des particules dans les fractions micellaires des digesta intestinaux, avant (ligne 1) et après 2 heures (ligne 2), 5 heures (ligne 3) et 20 heures (ligne 4) d'incubation, obtenus après la phase gastrique à pH 2,5 avec (A) et sans pepsine (B) ou à pH 4 avec (C) et sans pepsine (D) (n = 3 digestions indépendantes)

Figure 26 : Évolution du *Z-Average* (diamètre hydrodynamique) des particules présentes dans la phase micellaire au cours de l'incubation (n = 3)

Figure 27 : Profils granulométriques des milieux « témoins » (A) et « essais » (B) de l'émulsion Tween 80-PC au cours de la phase intestinale (n = 1)

Figure 28 : Évolution du pourcentage massique des triglycérides (barres blanches), phospholipides (barres noires), diglycérides (barres grises), monoglycérides (barres bleus) et acides gras libres (barres vertes) au cours de la digestion *in vitro* de l'émulsion Tween 80. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de 3 répétitions de cinétiques

Figure 29 : Formation du 4-HHE et du 4-HNE au cours de la digestion *in vitro* de l'émulsion d'huile de colza purifiée en présence de metmyoglobine. Les barres d'histogramme présentent les moyennes, les barres d'écarts types représentent ceux de mesures effectuées en triple

Figure 30 : Quantités de 4-HHE (A) et de 4-HNE (B) dans les milieux digestifs essai et témoins préparés à partir d'émulsion d'huile de colza purifiée en présence de metmyoglobine. Les barres d'histogramme présentent les moyennes, les barres d'écarts types représentent ceux de mesures effectuées en triple

Figure 31 : Quantités d'HPX (A) et de MDA (B) formés dans les émulsions et les milieux gastriques essais (barres noires) ou témoins (barres blanches) pour une concentration initiale en HPX de l'huile de colza de 5 µmol g^{-1} de lipides. (n = 1 digestion avec 2 mesures)

Figure 32 : Quantités d'oxygène consommé (A), d'HPX formés (B) et de MDA formé (C) dans les émulsions et les milieux gastriques et intestinaux essais (barres noires) ou témoins (barres blanches) pour une concentration initiale en HPX de l'huile de colza de 60 µmol g^{-1}de lipides. (n = 1 digestion avec 2 mesures pour le dosage des HPX et MDA)

Figure 33 : Consommation d'O_2 dans les milieux essai d'émulsion colza-SAB avec (barres noires) ou sans tocophérols (barres blanches) ou d'émulsion AGPI-LC n-3-SAB (barres grises). (n = 3 digestions indépendantes)

Figure 34 : Quantités d'HPX formés (A) et de MDA formé (B) dans les émulsions et les milieux essai d'émulsion colza-SAB avec (barres noires) ou sans tocophérols (barres blanches) ou d'émulsion AGPI-LC n-3-SAB (barres grises). (n = 3 digestions indépendantes)

Figure 35 : Effet de la composition en acides gras des émulsions stabilisées par la SAB sur la formation du 4-HHE (A) et du 4-HNE (B) dans les milieux digestifs « essais » lors de la digestion en présence de metmyoglobine. Les barres d'histogramme présentent les moyennes, les barres représentant les écarts types de mesures effectuées sur 3 digestions indépendantes. Les teneurs en tocophérols sont équivalentes

Figure 36 : Évolution de la concentration en 4-hydroxy-2-hexénal (A) et en 4-hydroxy-2-nonénal (B) au cours de la digestion de l'émulsion PC-Tween80 en présence de myoglobine 20 µM et en présence (barres noires) ou en absence (barres blanches) de sucs digestifs (n = 1 digestion)

Figure 37 : Composition en acides gras de l'émulsion « n-3_LC-Tween80-PC » (barres noires) et des milieux « essais » (barres blanches) et « témoins » (barres grises) au cours de sa digestion en présence de 20 µM de myoglobine. Les barres d'erreur représentent l'écart-type des 3 cinétiques indépendantes

Figure 38 : Quantités d'acides gras (g g^{-1} de lipides extraits) dans les émulsions « n-3_LC-Tween80-PC » natives (barres noires) et des milieux « essais » (barres blanches) et « témoins » (barres grises) en fin de digestion en présence de 20 µM de myoglobine. Les barres d'erreur représentent l'écart-type des 3 cinétiques indépendantes

Figure 39 : Concentrations de 4-HHE (ligne 1) et de 4-HNE (ligne 2) présents dans les contenus stomacaux (A) et intestinaux (B) et dans les plasmas (C) chez les souris à jeûn

Figure 40 : Concentrations de MDA (A), 4-HHE (B) et 4-HNE (C) présents dans le contenu stomacal à jeûn (gris) ou dans les milieux gastriques après gavage des souris avec une émulsion contenant des AGPI LC et stabilisée par la SAB (barres blanches) ou avec la même émulsion additionnée metmyoglobine (barres noires). Les barres d'erreurs représentent les écart-types de n = 6 prélèvements indépendants

Figure 41 : Quantités de MDA (A), 4-HHE (B) et 4-HNE (C) dans les contenus intestinaux des souris à jeûn (barres grises) ou après gavage avec l'émulsion en absence (barres blanches) ou non (barres noires) de metmyoglobine. (n = 6 prélèvements indépendants)

Figure 42 : Concentrations (nM) de MDA (A), 4-HHE (B) et 4-HNE (C) dans les plasmas des souris à jeûn (barres grises) et après gavage avec l'émulsion en absence (barres blanches) ou en présence (barres noires) de metmyoglobine 20µM. (n = 6 : 6 souris par mesure)

Figure 43 : Évolution colloidale des gouttelettes lipidiques en fin d'incubation gastrique en présence (A) ou en absence (B) de pepsine pour l'émulsion stabilisée par la SAB indépendament du pH, et en présence ou non de pepsine pour l'émulsion stabilisée par les tensioactifs à pH 2,5 (C)

Figure 44 : Distribution de taille des gouttelettes lipidiques présentes dans les émulsions huile de colza-SAB 10% natives (A) ou après dilution au 1/10ème dans du SDS 1% (B), ajustées ou non à pH 2,5 ou 4

LISTE DES TABLEAUX (HORS ARTICLES)

Tableau I : Compartiments du tractus digestif et leurs caractéristiques principales chez l'Homme

Tableau II : Caractéristiques et propriétés des lipases humaines

Tableau III : Composition en acides gras (% w/w) des émulsions (n=3)

Tableau IV : Teneurs en tocophérols des huiles des émulsions utilisées

Tableau V : Compartiments et conditions digestives retenus pour la conception du modèle digestif gastro-intestinal

Tableau VI : Préparation des échantillons pour les analyses granulométriques et l'extraction des lipides

Tableau VII : Rendements gravimétriques d'extraction des lipides d'émulsions et de milieux digestifs obtenus par les méthodes hexane-isopropanol vs Bligh & Dyer

Tableau VIII : Composition lipidique des extraits de milieux intestinaux par les méthodes hexane-isopropanol et Bligh & Dyer

Tableau IX : Volumes de HCl à ajouter aux milieux gastriques avant incubation et de $NaHCO_3$ à ajouter après incubation pour ajuster le pH des milieux digestifs pour les émulsions stabilisées par la SAB

Tableau X : Volumes de HCl à ajouter aux milieux gastriques avant incubation et de $NaHCO_3$ à ajouter après incubation pour ajuster le pH des milieux digestifs pour les émulsions stabilisées par les tensioactifs (Tween 80/PC)

Tableau XI : Teneurs en marqueurs d'oxydation dans les milieux digestifs et rapports molaires des AG présents dans l'huile émulsifiée pour les émulsions stabilisées par les tensioactifs (Tween 80/PC)

SOMMAIRE

DÉDICACE ..... **I**

REMERCIEMENTS ..... **II**

AVANT-PROPOS ..... **V**

LISTE DES PUBLICATIONS ..... **VII**

LISTE DES ABRÉVIATIONS ..... **IX**

LISTE DES FIGURES (HORS ARTICLES) ..... **X**

LISTE DES TABLEAUX (HORS ARTICLES) ..... **XIV**

INTRODUCTION **1**

I- REVUE DE LA LITTÉRATURE **5**

I-1- LES BASES MOLÉCULAIRES DE LA STRUCTURE DES LIPIDES 5

I-1-1- Les acides gras **6**

I-1-2- Les triacylglycérols **7**

I-1-3- Les phospholipides **7**

I-1-4- Les sels biliaires **8**

I-2- STRUCTURES SUPRAMOLÉCULAIRES DES LIPIDES ALIMENTAIRES : L'EXEMPLE DES ÉMULSIONS HUILE – EAU 10

I-2-1- Nature et caractéristiques des interfaces **11**

I-2-2- Stabilisation et déstabilisation physique des émulsions (floculation, coalescence) **12**

I-2-3- Agents stabilisants **13**

I-3- FONCTIONS BIOLOGIQUES ET EFFETS SANTÉ DES ACIDES GRAS 14

I-4- ASPECTS GÉNÉRAUX DE LA DIGESTION DES LIPIDES CHEZ L'HOMME 17

I-4-1- Anatomie, compartimentation **18**

I-4-2- Les sécrétions digestives **20**

I-4-2-1- La salive 20

I-4-2-2- Le suc gastrique 21

I-4-2-3- Le suc pancréatique 22

I-4-2-4- La bile 23

I-4-2-5- Le suc intestinal 24

I-5- LA DIGESTION DES LIPIDES 24

I-5-1- Les lipases **24**

I-5-1-1- La lipase gastrique humaine (LG) : EC 3.1.1.3 24

I-5-1-2- les lipases pancréatiques 25

I-5-1-2-1- La lipase pancréatique (LP) : EC 3.1.1.3 26

I-5-1-2-2- Les protéines à activité lipase pancréatique..... 27

I-5-1-2-3- La lipase stimulée par les sels biliaires ou cholestérol estérase : EC 3.1.1. .. 27

I-5-1-3- La phospholipase A_2 (PLA_2) : EC 3.1.1.4.....28

I-5-1-4- La sphingomyélinase et la céramidase 28

I-5-2- Évolution des lipides dans les différents compartiments digestifs en lien avec leur structure dans l'aliment 29

I-5-2-1- Évolution des structures des lipides dans la bouche.....30

I-5-2-2- Évolution dans le compartiment gastrique 31

I-5-2-3- Évolution dans le compartiment intestinal 33

I-5-3- Propriétés des lipides pouvant affecter leur digestion.....34

I-6- OXYDATION DES LIPIDES DANS LES ALIMENTS ET AU COURS DE LA DIGESTION.....35

I-6-1- Mécanisme général de l'oxydation des lipides 35

I-6-2- (Article 1) Devenir oxydatif des structures lipidiques dans les aliments et au cours de la digestion 37

I-6-3- Formation et réactivité de quelques marqueurs biologiques de l'oxydation des lipides.....59

I-6-4- Protection des lipides contre l'oxydation dans les aliments et au cours de la digestion.....62

I-6-4-2- les antioxydants primaires 62

I-6-4-2- les antioxydants secondaires.....63

II- DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE.....65

III- MATÉRIELS ET MÉTHODES.....69

III-1- MATÉRIELS 69

III-1-1- Les lipides et émulsifiants 69

III-1-2- Les autres produits chimiques.....72

III-2- MÉTHODES 73

III-2-1- Caractérisation des matières premières 73

III-2-1-1- Détermination de la composition et de la teneur en AG des lipides 73

III-2-1-2- Dosage des tocophérols.....74

III-2-1-3- Purification des huiles.....75

III-2-2- Préparation et caractérisation des émulsions 76

III-2-2-1- Description des émulsions 76

III-2-2-2- Préparation des émulsions 77
III-2-2-3- Teneur en protéines dans la phase aqueuse 78
III-2-3- Protocoles de digestion *in vitro* 79
II-2-3-1- Protocole *in vitro* pour le suivi de la lipolyse et de l'évolution des structures 79
II-2-3-2- Protocole *in vitro* pour le suivi de l'oxydation des lipides 83
III-2-4- Détermination de la taille et de l'organisation des particules dans les différents milieux 84
III-2-4-1- Par diffusion statique de la lumière (*SLS*) 84
III-2-4-2- Par diffusion dynamique de la lumière (*DLS*) 86
III-2-4-3- Par microscopique optique 87
III-2-5- Détermination de l'hydrolyse 87
III-2-5-1- Hydrolyse des protéines par électrophorèse 87
III-2-5-2- Évaluation de la lipolyse 88
III-2-5-2-1- Extraction des lipides par la méthode de Bligh & Dyer (1959) 88
III-2-5-2-2- Extraction des lipides par la méthode hexane-isopropanol (Hara and Radin, 1978) 89
III-2-5-2-3- Séparation, identification et quantification des produits de lipolyse 90
III-2-6- Suivi de l'oxydation des lipides au cours de la digestion 91
III-2-6-1- Détermination de la consommation d'oxygène 91
III-2-6-2- Dosage des hydroperoxydes 93
III-2-6-3- Dosage du malondialdéhyde (MDA) 94
III-2-6-4- Dosage du 4-hydroxy-2-nonénal et du 4-hydroxy-2-hexénal 96
III-2-7- Études *in vivo* après gavage chez la souris 97
III-2-8- Analyses et traitements statistiques 99
IV- RÉSULTATS ET DISCUSSION 101
IV-1- ÉVOLUTION DES STRUCTURES ET DE LA LIPOLYSE AU COURS DE LA DIGESTION IN VITRO DES ÉMULSIONS 102
IV-1-1- Mises au point et optimisations 102
IV-1-1-1- Évolution du pH lors de la digestion de l'émulsion colza-SAB 102
IV-1-1-2- Choix de la méthode d'extraction des lipides 103
IV-1-1-3- Identification et quantification des classes lipidiques par HPLC 106
IV-1-1-4- Choix du moyen de représentation des résultats granulométriques dans les milieux gastriques 110

IV-1-1-5- Choix du moyen de représentation des résultats granulométriques dans les milieux intestinaux 112
IV-1-2- Évolution au cours de la digestion *in vitro* de l'émulsion colza-SAB 115
IV-1-2-1- (Article 2) Évolution de la taille et de l'organisation des gouttelettes lipidiques ainsi que de la lipolyse 115
IV-1-2-2- Hydrolyse des protéines au cours de la phase gastrique 135
IV-1-2-3- Microscopie optique des milieux intestinaux 136
IV-1-2-4- Distribution de taille des particules lipidiques présentes dans les phases micellaires 137
IV-1-3- Évolution au cours de la digestion in vitro de l'émulsion riche en AGPI n-3 LC et stabilisée par les tensioactifs 140
IV-1-3-1- Évolution des structures colloïdales 140
IV-1-3-2- Évolution de la lipolyse 142
IV-2- OXYDATION DES LIPIDES ÉMULSIFIÉS AU COURS DE LA DIGESTION 144
IV-2-1- Adaptation du protocole digestif pour l'étude de l'oxydation 144
IV-2-2- Émulsion d'huile de colza stabilisée par la SAB 147
IV-2-2-1- (Article 3) Effets de la composition des milieux digestifs et des conditions digestives sur l'oxydation des lipides : rôle des sucs digestifs, des tocophérols et d'un initiateur de l'oxydation 147
IV-2-2-2- Évolution des marqueurs spécifiques des AGPI 161
IV-2-2-3- Effet du niveau initial d'oxydation des lipides (hydroperoxydes) sur l'oxydation au cours de la digestion 163
IV-2-3- Effet de la nature de chaines d'acides gras (insaturation et longueur de chaine) sur l'oxydation des lipides émulsionnés au cours de la digestion 165
IV-2-4- (Article 4) Effet de la taille des gouttelettes lipidiques, de la nature des émulsifiants et de la composition des milieux digestifs sur l'oxydation des lipides 169
IV-2-5- Évolution des concentrations en hydroxyalcénals 193
IV-2-6- Possibles conséquences nutritionnelles de l'oxydation des lipides *in vitro* 194
IV-3- ÉTUDE *IN VIVO* CHEZ LA SOURIS APRÈS GAVAGE AVEC UNE ÉMULSION MODÈLE 196
IV-3-1- Niveau des marqueurs à jeûn dans les compartiments 197
IV-3-2- Évolution des marqueurs des produits secondaires de l'oxydation des lipides dans les contenus gastriques 198

IV-3-2- Évolution des marqueurs des produits secondaires de l'oxydation des lipides dans contenus intestinaux 200
IV-3-3- Évolution des marqueurs des produits secondaires de l'oxydation des lipides dans le plasma 201
V- DISCUSSION GÉNÉRALE 205
CONCLUSION GÉNÉRALE 219
PERSPECTIVES 223
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 225
ANNEXES ..... a

INTRODUCTION

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) occupent dans l'alimentation une place privilégiée du fait de leurs rôles dans le développement nerveux, rétinien et cérébral, dans la synthèse de molécules biologiquement actives, le processus inflammatoire et dans la régulation génique (Gil *et al.*, 2012). Les AGPI de la famille n-3 (oméga-3), et notamment les acides docosahexaénoïque (DHA) et eicosapentaénoïque (EPA) sont spécifiquement impliqués dans les mécanismes associés à la protection contre l'inflammation et l'apparition du syndrome métabolique. Ils participent également à la prévention primaire et secondaire de nombreuses pathologies dégénératives et cardiovasculaires. Cependant, pour exprimer ces effets bénéfiques, les apports en oméga-3 doivent être suffisants. Ceci implique la couverture, non seulement des besoins globaux en AGPI, mais aussi des besoins spécifiques en DHA et EPA d'une part et en acides α-linolénique et linoléique d'autre part (Sinclair, 1980 ; AFSSA, 2010). Or, pour de nombreuses populations, en France comme dans le reste du monde, les apports en AGPI oméga-3 sont inférieurs aux recommandations nutritionnelles (Trautwein, 2001 ; AFSSA, 2009 ; Molendi-Coste *et al.*, 2011). Les organismes de surveillance alimentaire et nutritionnelle recommandent à ce titre l'augmentation de la consommation des aliments qui en sont riches comme les produits de la mer. Différents aliments habituellement consommés peuvent également être enrichis soit directement par l'apport d'ingrédients riches en AGPI dans les formulations, soit indirectement *via* l'alimentation des animaux. Cette voie est souvent considérée comme un moyen efficace et fiable pour obtenir les bénéfices santés attendus sans avoir recours à des pratiques de supplémentation individuelle (Kolanowski *et al.*, 1999 ; American Dietetic Association, 2001). La production d'aliments enrichis en AGPI n-3 représente ainsi un fort enjeu socio-économique.

Cependant les AGPI n-3, de par leur structure chimique comportant de nombreuses insaturations, sont des molécules fragiles particulièrement sensibles à l'attaque oxydative par le dioxygène (Coupland and McClements, 1996 ; McClements and Decker, 2000 ; Frankel, 2005 ; Kamal-Eldin and Min, 2009). De ce fait, les aliments qui les contiennent, héritent de cet inconvénient. L'oxydation conduit à la formation de produits de propriétés physico-chimiques et biologiques variées dont les effets potentiellement néfastes sur les qualités organoleptiques et sanitaires des aliments sont modulés par leur concentration. Des nutriments et micronutriments bénéfiques peuvent être perdus, diminuant la valeur nutritionnelle des produits. Cependant en raison des très faibles seuils de détections sensoriels de certains composés volatils issus de l'oxydation, leur présence en très faibles quantités entraîne le rejet

des aliments par le consommateur. L'idée qui a donc prévalu jusqu'alors est que, dans des pratiques courantes et légales de production et consommation des aliments, il n'y a pas de risques nutritionnels ou sanitaires liés à la consommation de lipides oxydés.

Or, depuis les travaux pionniers de Kanner et de ses collaborateurs (Kanner and Lapidot, 2001 ; Gorelik *et al.*, 2007) portant sur les conditions pro-oxydantes rencontrées dans l'estomac d'une part, et la mise en évidence du lien entre consommation de viande rouge, phénomènes oxydatifs induits au sein du tractus gastro-intestinal (TGI) et prévalence du cancer colorectal d'autre part (Pierre *et al.*, 2006 ; Davis and Wu, 2012), la communauté scientifique s'interroge sur les niveaux d'oxydation des lipides en conditions digestives et leurs conséquences possibles sur la santé du consommateur. Certains produits de l'oxydation des lipides, du fait de leur spécificité, de leur toxicité élevée et de leur implication dans le processus du stress oxydant sont reconnus comme biomarqueurs du stress oxydant *in vivo*. Parmi ces marqueurs, les plus étudiés sont le malondialdéhyde (MDA) et les hydroxyalcénals (Esterbauer *et al.*, 1991 ; Esterbauer, 1993). Cependant, si des travaux de la littérature laissent supposer que ces molécules se forment au cours de la digestion, peu d'informations concernent les quantités réellement formées. De même, il y a peu d'informations sur les mécanismes par lesquels la composition du bol alimentaire et les modifications physiques et chimiques subies par les aliments au cours de la digestion peuvent affecter l'oxydation des lipides et les niveaux de production de ces marqueurs spécifiques. Or la structure moléculaire des lipides, leur organisation sous forme de structures supramoléculaires, notamment sous forme de gouttelettes lipidiques de tailles variées sur lesquelles sont adsorbées des molécules tensioactives de nature protéique ou lipidique, sont des facteurs pouvant moduler à la fois la bioaccessibilité des nutriments hydrophobes (Armand *et al.*, 1999 ; Favé *et al.*, 2004) et l'oxydation lipidique (Genot *et al.*, in press).

Dans ce contexte, ce travail de thèse avait pour objectif de déterminer *in vitro*, si les structures moléculaires, la taille et l'organisation initiale des gouttelettes de lipides alimentaires et leur évolution au cours de la digestion modulent la lipolyse et la formation de produits d'oxydation des lipides. Il s'agissait en particulier de préciser l'importance de paramètres liés à la composition des milieux de digestion sur les évolutions des structures des lipides émulsifiés, la lipolyse, et l'oxydation. Pour cela, une stratégie à quatre niveaux a été mise en place. Le premier niveau a consisté en la fabrication d'émulsions huile-dans-eau dans lesquelles les lipides vecteurs d'AGPI sont présents dans des structures supramoléculaires bien définies. Le second niveau a consisté en la caractérisation fine au cours du processus de digestion

in vitro, de l'évolution des structures colloïdales et moléculaires (lipolyse) des lipides, ces évolutions étant supposées susceptibles de modifier leur oxydation. Le troisième niveau a consisté en la détermination de la lipolyse et la caractérisation de l'oxydation des lipides dans les conditions digestives simulées. Au cours de ces études, les influences de paramètres liés aux milieux de digestion (pH, présence et composition des fluides digestifs simulés ; présence de metmyoglobine) ou aux caractéristiques des émulsions modèles (taille et nature de l'interface, composition des lipides, notamment en AGPI oméga-3 et en tocophérols) ont été envisagées. Enfin, le quatrième niveau a consisté en la comparaison des résultats obtenus *in vitro* avec des analyses réalisées chez la souris à l'issue d'un gavage avec une émulsion modèle. Dans ce cas l'impact de la présence de metmyoglobine a été plus particulièrement regardé.

Les résultats relatifs à ces expérimentations sont présentés dans le chapitre IV de ce document qui fait suite à une synthèse de la littérature relative à ce travail (chapitre I) et à la présentation de la démarche (chapitre II) et de la méthodologie (chapitre III) utilisées. L'ensemble des résultats est discuté dans le Chapitre V et mis en perspectives dans la conclusion générale.

I- REVUE DE LA LITTÉRATURE

Un pré-requis de cette thèse traitant de l'évolution des structures lipidiques et de l'oxydation au cours de la digestion était de faire le point sur l'état des connaissances sur les processus de digestion des lipides et sur les mécanismes principaux de l'oxydation des lipides et les facteurs susceptibles de les influencer. Dans cette synthèse bibliographique, après avoir fourni quelques éléments sur l'importance des AGPI n-3, et en particulier les AGPI longues chaînes (AGPI LC) pour la santé, nous rappellerons brièvement les bases moléculaires de la structure des lipides. Puis il s'agira de présenter l'organisation supramoléculaire des lipides alimentaires, avec un intérêt particulier porté aux émulsions huile-dans-eau, à leurs caractéristiques principales et aux phénomènes physiques régissant leur stabilisation et déstabilisation. Les émulsions huile-dans-eau sont le modèle choisi pour notre étude du devenir des lipides alimentaires au cours de la digestion. Puis, après avoir présenté les aspects généraux de la digestion chez l'Homme, un état des connaissances sera spécifiquement effectué sur l'évolution des lipides émulsifiés dans le tractus gastro-intestinal (TGI). De récentes études ont montré que l'estomac est un compartiment propice à l'oxydation des lipides. Peu de travaux avaient porté sur cette question au moment où j'ai commencé mon travail de thèse. La dernière partie de cette synthèse bibliographique, présentée sous forme d'un projet d'article, fait le point sur l'état des connaissances sur l'oxydation des lipides dans les aliments, puis au cours de la digestion et enfin sur les conséquences métaboliques de ce processus. La double influence de la composition des aliments, de l'environnement digestif et/ou de la lipolyse y sont particulièrement soulignés.

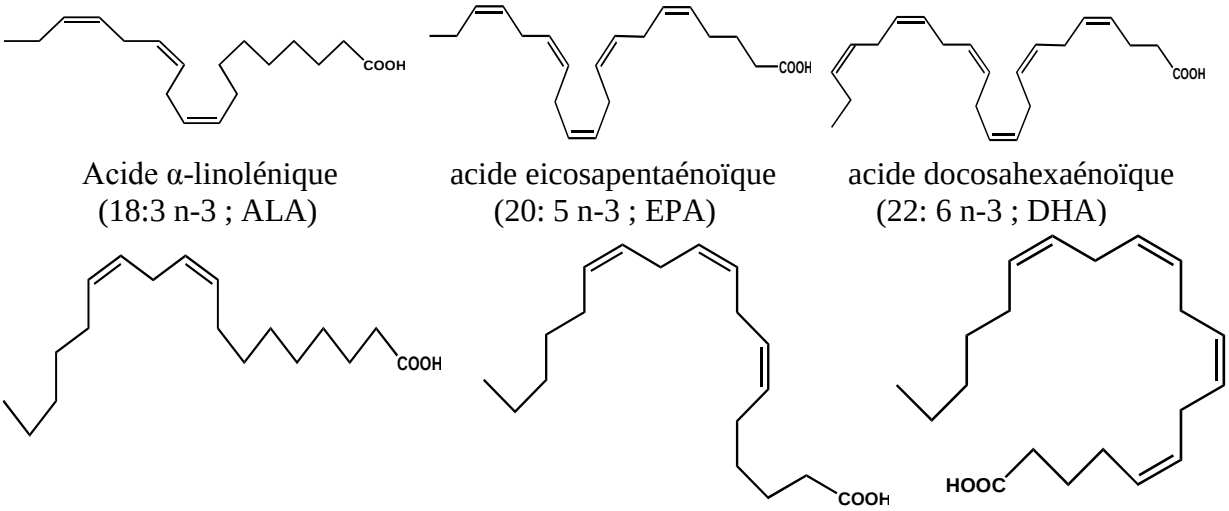
I-1- LES BASES MOLÉCULAIRES DE LA STRUCTURE DES LIPIDES

Les lipides sont un ensemble hétérogène de substances organiques insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques apolaires comme l'hexane et le chloroforme. Ils sont caractérisés par la présence dans leur molécule d'au moins un acide gras ou d'une chaîne hydrophobe. En raison de leur insolubilité dans l'eau, le cholestérol et ses esters, les stéroïdes, la vitamine D et les cérides (esters d'acides gras et d'alcools aliphatiques à longue chaîne ou alcool gras) sont rattachés aux lipides. Par souci de concision, ne seront présentés dans cette partie que les principaux composés lipidiques susceptibles d'être utilisés au cours de cette étude. Il s'agit précisément des acides gras, des triglycérides (triacylglycérols), des phospholipides et des sels biliaires qui ont une fonction cruciale dans la digestion des lipides.

I-1-1- Les acides gras

Les acides gras (AG) sont des acides organiques contenant une fonction carboxylique et une chaîne hydrocarbonée de longueur variable. Ils sont caractérisés par : le nombre de carbone (généralement pair), la ramification possible de leur chaîne hydrocarbonée, leur degré d'insaturation, la position des doubles liaisons (en particulier de la première) sur la chaîne hydrocarbonée, et l'isomérie des doubles liaisons. L'insaturation est définie par le nombre de doubles liaisons présentes dans la chaîne carbonée. On distingue ainsi les acides gras saturés (AGS), les acides gras monoinsaturés (AGMI) et les acides gras polyinsaturés (AGPI) possédant au moins deux doubles liaisons. En nomenclature systématique la position des doubles liaisons est numérotée en référence au carbone carboxylique terminal. Le sigle Δ- est alors utilisé pour identifier la position de la double liaison. Les AG insaturés sont couramment classés en 3 familles principales correspondant à la nomenclature physiologique liée à la position du carbone de la première double liaison par rapport à l'extrémité méthyle terminale. Cette double liaison est identifiée par la lettre ω ou le sigle n- suivi d'un chiffre représentant cette position. On a ainsi les acides gras oméga-3 (ω-3 ou n-3), les oméga-6 (ω-6 ou n-6) et les oméga-9 (ω-9 ou n-9).

Les principaux représentants des AGPI des séries n-3 et n-6 sont présentés ci-dessous.



Acide α-linolénique (18:3 n-3 ; ALA) | acide eicosapentaénoïque (20: 5 n-3 ; EPA) | acide docosahexaénoïque (22: 6 n-3 ; DHA)

acide linoléique (18:2 n-6 ; LA) | acide γ-linolénique (18:3 n-6 ; γ-LA) | acide arachidonique (20:4 n-6 ; AA)

Figure 1 : Structure chimique des principaux acides gras poly-insaturés

Ces AG ont des fonctions différentes dans les aliments et dans les organismes vivants, humains notamment.

I-1-2- Les triacylglycérols

Dans les aliments, les AG se trouvent majoritairement sous forme de triglycérides ou triacylglycérols (TAG) qui représentent l'essentiel des lipides dits neutres. Ce sont des triesters d'AG et de glycérol. Les AG occupent les positions *sn*-1, *sn*-2 ou *sn*-3 (Fig. 2) sur le glycérol selon la numérotation stéréospécifique (*sn*). Dans les lipides naturels, la structure moléculaire est déterminée par les processus de synthèse *in vivo* ; de ce fait, la répartition des acides gras sur le glycérol ne se fait pas au hasard.

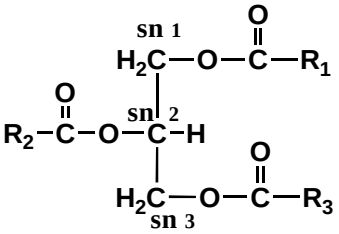


Figure 2 : Représentation schématique d'une molécule de triacylglycérol

Les triacylglycérols sont les substrats des lipases qui, par hydrolyse, libèrent des acides gras (acides gras libres : AGL), des diglycérides (diacylglycérols : DAG), des monoglycérides (monoacylglycérols ; MAG) et *in fine* du glycérol.

I-1-3- Les phospholipides

Les phospholipides sont une classe de lipides contenant un acide phosphorique estérifié en position *sn*-3 du glycérol ou sur la sphingosine. Ils sont divisés en deux sous-classes, les glycérophospholipides et les sphingolipides.

Les glycérophospholipides ou phosphoacylglycérols, sont des triesters du glycérol dans lesquels les positions *sn*-1 et *sn*-2 sont estérifiées par des AG et la fonction alcool en *sn*-3 est naturellement estérifiée par un acide phosphorique, lui-même généralement associé à une amine (choline, éthanolamine, sérine) ou à un sucre (inositol). La phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine sont 2 phospholipides alimentaires majeurs. Par ailleurs, environ 8 g de phospholipides endogènes (dont 98% de phosphatidylcholine) sont déversés par jour dans l'intestin via la bile. En raison de leur amphiphilie (hydrophilie liée aux fonctions phosphoryle, amine et/ou osidique et hydrophobie liée aux AG), les phospholipides jouent un rôle majeur de constituant des membranes cellulaires. Ce sont également des molécules tensioactives qui possèdent des caractéristiques d'émulsifiants. Ces propriétés émulsifiantes sont largement utilisées en technologie alimentaire.

L'action des phospholipases A_2 sur les phospholipides libère des acides gras libres et des lysophospholipides.

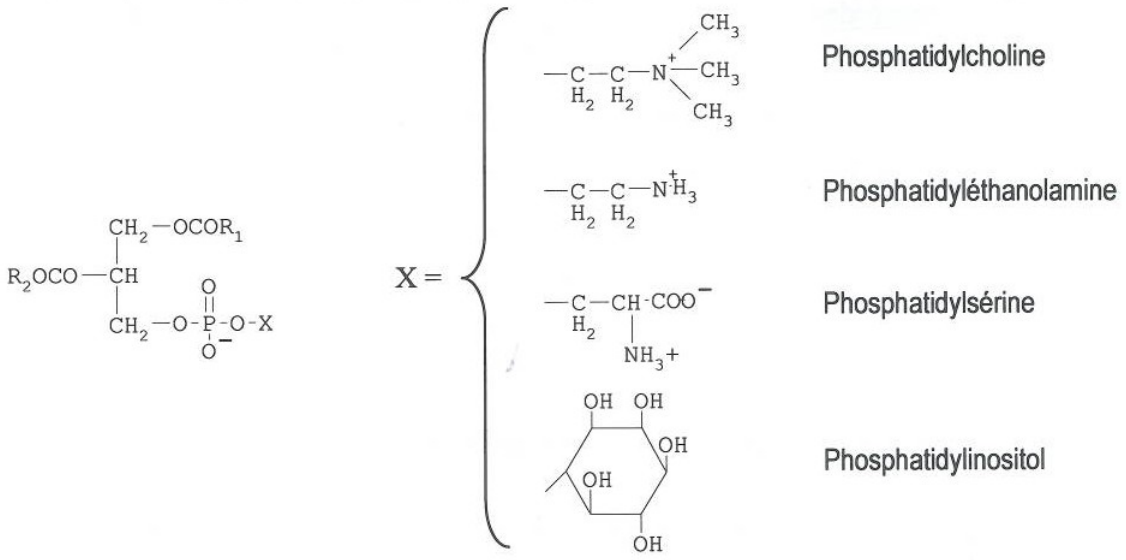


Figure 3 : Structures des principaux phospholipides

I-1-4- Les sels biliaires

Le cholestérol et les stérols sont des composés qui, du fait de leur hydrophobie et de leur structure, sont considérés comme des constituants lipidiques. Les sels biliaires sont des dérivés du cholestérol d'une grande importance pour la digestion des lipides. Ce sont les sels de sodium et de potassium de 4 acides biliaires, notamment les acides cholique, chénodésoxycholique, désoxycholique et, en quantité très faible, d'acide lithocholique (Fig. 4). La forme acide (acides biliaires) est le plus souvent conjuguée à la glycine ou à la taurine par une liaison peptidique. Les sels biliaires favorisent l'émulsification des lipides alimentaires dans le duodénum et par conséquent, augmentent la surface de contact entre ces derniers et les lipases, facilitant ainsi l'action hydrolytique de celles-ci.

Chez l'Homme, les sels biliaires sont essentiellement constitués de glycocholate (31 % p/p), glycochénodésoxycholate (28 % p/p), glycodésoxycholate (17 % p/p), taurocholate (10 % p/p), taurochénodésoxycholate (9 % p/p) et taurodésoxycholate (5 % p/p) (Meunier *et al.*, 1988).

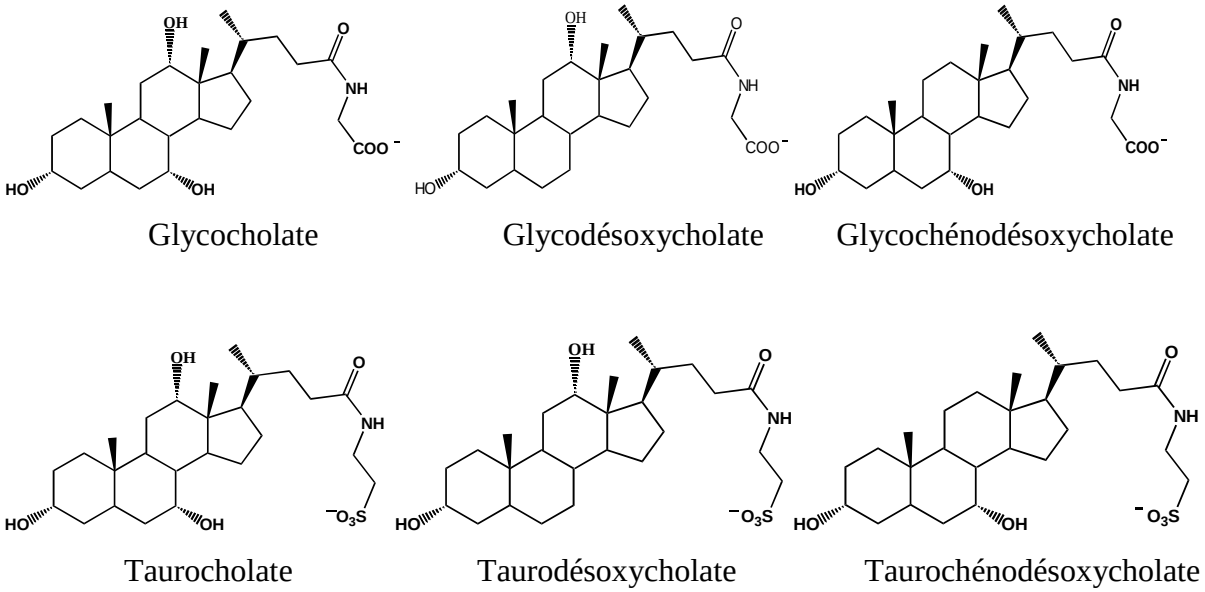


Figure 4 : Structure chimique des principaux sels biliaires

En milieu aqueux, lorsqu'ils sont à une concentration supérieure à leur concentration micellaire critique (CMC), les sels biliaires s'organisent sous forme de micelles dans lesquelles ils se placent dos à dos du fait de leur forme moléculaire (Fig. 5). Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour l'évaluation de la CMC des sels biliaires. Indépendament de la technique utilisée, la CMC des sels biliaires pris individuellement varie de 0,6 à 16 mM (cholate de sodium : 4-16 mM ; taurocholate de sodium et désoxycholate de sodium : 2-7 mM ; taurodésoxycholate de sodium : 0,6-2 mM ; acide chénodésoxycholique : 4 mM ; acide ursodésoxycholique: 4 mM ; acide hyodésoxycholique : 6 mM ; acide hyocholique : 8 mM ; acide glycodésoxycholique : 2 mM ; acide glycocholique : 10 mM ; acide glycochénodésoxycholique : 2 mM) (Roda *et al.*, 1983 ; Coello *et al.*, 1996 ; Nakashima *et al.*, 2002). A des concentrations de l'ordre que quelques dizaines de fois la CMC, les sels biliaires forment des micelles dites primaires. A des concentrations plus élevées (centaines de fois la CMC), ils s'organisent sous forme de micelles secondaires plus grosses ayant un nombre d'agrégation supérieur à 20 (Fig. 5). Ces dernières sont constituées de juxtaposition de micelles primaires reliées par des liaisons hydrogènes.

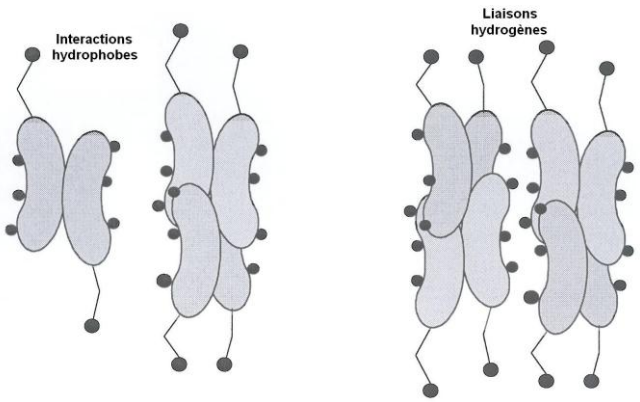


Figure 5 : Organisation des structures supramoléculaires des sels biliaires (Mukhopadhyay and Maitra, 2004)

I-2- STRUCTURES SUPRAMOLÉCULAIRES DES LIPIDES ALIMENTAIRES : L'EXEMPLE DES ÉMULSIONS HUILE – EAU

Dans les aliments, les lipides peuvent être liquides ou solides et s'organisent en phases continues ou discontinues. Les lipides forment en présence d'eau de multiples structures. Du fait de la prévalence des triglycérides dans les lipides alimentaires, les structures les plus fréquemment rencontrées dans les systèmes formulés hydratés sont des globules, ou des gouttelettes de TAG dispersés dans la phase aqueuse et stabilisés par des émulsifiants ou agents de surface (protéines, phospholipides, MAG, tensioactifs de synthèse tels que les polysorbates, …). Ils forment ainsi des émulsions huile-dans-eau (H/E). On rencontre ces structures dans de nombreux aliments ; les émulsions peuvent être naturelles (lait, …) ou formulées (mayonnaise, soupe, vinaigrette, …) (McClements, 2005). Dans d'autres cas, la phase aqueuse est dispersée dans la phase lipidique, formant une émulsion eau dans huile (E/H) comme c'est le cas pour le beurre ou les margarines. La formulation peut permettre de produire également des émulsions multiples comme des émulsions H/E/H (fines gouttelettes d'huile dispersées dans des globules d'eau, lesquels sont à leur tour dispersés dans une phase continue lipidique) et E/H/E (Garti, 1997 ; Benichou *et al.*, 2004). Nous ne nous intéresserons dans ce travail qu'aux émulsions huile-dans-eau qui sont considérées comme des modèles d'aliments de référence.

Dans une émulsion les phases huileuse et aqueuse sont séparées par une interface sur laquelle sont adsorbées des molécules ayant une activité de surface (protéines libres ou agrégées, polysaccharides, phospholipides, …). La phase aqueuse contient de nombreux composés hydrophiles tels les sels, les acides, les bases, les agents tensioactifs hydrophiles, les protéines et les ions métalliques entre autres. La phase lipidique quant à elle contient des

molécules lipophiles telles les TAG, DAG, MAG, AGL, vitamines liposolubles, stérols, … (McClements, 2005).

Les émulsions alimentaires sont caractérisées par la nature de l'interface et des phases dispersée et dispersante, la fraction volumique en huile et la distribution en taille des gouttelettes lipidiques ainsi que par leur stabilité physique. Les gouttelettes lipidiques dans les émulsions alimentaires ont des tailles qui peuvent aller d'une centaine de nanomètres à quelques micromètres (0,1 à 100 µm) (Dickinson and Stainsby, 1982 ; Dickinson, 1992). Les nanoémulsions possèdent des tailles des gouttelettes de l'ordre de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres (typiquement 20-200 nm) (Solans *et al.*, 2005). Dans les émulsions H/E, la taille ou le diamètre des gouttelettes détermine la surface de contact entre les phases dispersée et continue, paramètre important dans les processus d'oxydation et de digestion de la matière grasse. La surface (en m^2 g^{-1}) des gouttelettes est inversement proportionnelle au diamètre en surface des gouttelettes. $S = 6/d_{3,2}$.

I-2-1- Nature et caractéristiques des interfaces

L'interface constitue la zone de séparation entre le cœur lipidique des gouttelettes d'huile et le milieu aqueux. On peut la représenter comme une fine couche qui entoure la gouttelette lipidique. Elle est constituée principalement de substances tensioactives, mais on peut également y retrouver des molécules d'eau ou de TAG (McClements, 2005). L'épaisseur de l'interface est de quelques nanomètres et ses propriétés varient de la partie hydrophobe à la partie hydrophile (Dickinson and McClements, 1995). L'interface peut être caractérisée par sa composition, sa structure, son épaisseur, sa rhéologie et sa charge électrique (McClements, 2005) qui sont fonction de la nature, de la concentration et de l'organisation des molécules qui la composent (McClements and Decker, 2000). L'épaisseur et la rhéologie des interfaces quant à elles peuvent déterminer la stabilité des émulsions par leurs effets sur la séparation gravitationnelle, la floculation et la coalescence.

De nombreux tensioactifs alimentaires sont électriquement chargés. Ils confèrent à la couche interfaciale entourant les gouttelettes d'huile une charge électrique d'intensité et de signe déterminés par le pH de la phase aqueuse, la nature et la concentration des espèces tensioactives chargées présentes. Selon que l'interface sera chargée positivement ou négativement, elle aura une fonction attractive ou répulsive notamment vis-à-vis des ions métalliques qui sont pro-oxydants. Le potentiel zêta (noté potentiel ζ) est le potentiel de surface effectif d'une gouttelette dans un milieu. Il prend en compte le fait que les espèces

chargées du milieu environnant peuvent s'adsorber à la surface de la gouttelette et altérer sa charge nette (McClements, 2005).

Ces caractéristiques confèrent à l'interface une fonction de barrière physique et ou chimique pouvant avoir des effets lors des processus de digestion des lipides et/ou de leur oxydation.

I-2-2- Stabilisation et déstabilisation physique des émulsions (floculation, coalescence)

Les émulsions sont des systèmes thermodynamiquement instables. La stabilité des émulsions et leur déstabilisation sont sous le contrôle de phénomènes physiques qui déterminent plusieurs mécanismes principaux de déstabilisation. On distingue ainsi le crémage, la floculation, le mûrissement d'Oswald et la coalescence.

Le crémage consiste en la séparation des gouttelettes lipidiques dispersées dans la phase aqueuse qui effectuent un mouvement ascendant sous l'effet gravitationnel. Le crémage est influencé par les densités des phases dispersante et dispersée, par la viscosité de la phase dispersante ainsi que par la concentration et la taille des gouttelettes lipidiques (Chanamai and McClements, 2000b, 2000c). Ainsi, la vitesse de crémage est supérieure pour les grosses gouttelettes comparées aux petites (Pinfield *et al.*, 1997). A des concentrations faibles ou intermédiaires, les agrégats (flocs) de gouttelettes crèment plus vite (Chanamai and McClements, 2000a) que les gouttelettes individuelles contrairement au cas dans lequel les concentrations en flocs sont élevées, pour lequel ce phénomène est retardé (McClements, 2005).

La floculation et la coalescence quant à elles consistent respectivement en une agrégation ou une fusion des gouttelettes lipidiques avec conservation ou perte de l'individualité des gouttelettes lipidiques. Elles peuvent être initiées par les mouvements des gouttelettes sous l'effet de l'énergie thermique, la gravité ou les forces mécaniques. Les gouttelettes en mouvement entrent en contact et peuvent se repousser ou s'agréger en fonction de la composition, du pH et de la force ionique de la phase dispersante et de la nature de l'interface.

La floculation est sous le contrôle de plusieurs effets (McClements, 2005). En fonction de la nature des molécules adsorbées à l'interface, de la force ionique et du pH, les gouttelettes lipidiques peuvent être électriquement chargées. Si les gouttelettes de mêmes charges qui se repoussent sont peu sensibles à la floculation, celles qui ne présentent pas de charge électrique (pH et/ou écrantage ionique de charge) sont fortement sensibles à la

floculation. La présence de biopolymères (protéines, polysaccharides) aux interfaces peut conduire, du fait d'interactions électrostatiques et hydrophobes et/ou de liaisons hydrogènes inter-gouttelettes, à la floculation par pontage *via* la formation de « ponts » entre les gouttelettes. Ce phénomène est également observé avec des gouttelettes chargées lorsque les biopolymères non adsorbés présents dans la phase aqueuse sont de charge contraire. La présence en grande quantité de biopolymères et de tensioactifs non adsorbés dans la phase continue peut conduire à la floculation par déplétion. En effet, l'effet osmotique associé à l'exclusion des particules colloïdales de la couche de phase continue entourant les gouttelettes provoque une augmentation de la force attractive entre elles (McClements, 2005). La floculation se produit lorsque la force attractive est supérieure aux forces répulsives (Jenkins and Snowden, 1996).

Contrairement à la floculation qui est un phénomène réversible, la coalescence est irréversible. Elle survient après contact des gouttelettes lorsqu'il y a rupture du film interfacial et fusion des gouttelettes. On obtient ainsi des gouttelettes avec un diamètre plus important. Ce phénomène, favorisé par la floculation, est influencé par la nature de l'émulsifiant, l'épaisseur du film interfacial, l'agitation, la congélation, le séchage.

Enfin le mûrissement d'Oswald correspond à la croissance des grosses gouttelettes au détriment des petites gouttelettes par transfert de masse de molécules de la phase dispersée depuis les petites gouttelettes (Kabalnov and Shchukin, 1992 ; McClements, 2005). Il nécessite que les constituants de la phase dispersée soient solubles, même à faible concentration, dans la phase continue, ce qui n'est pas le cas des TAG à longue chaîne vis-à-vis d'une phase aqueuse.

I-2-3- Agents stabilisants

Si les émulsions sont des systèmes instables, il est possible de former des émulsions cinétiquement stables (métastables) pour une période de temps raisonnable (jour(s), semaine(s), mois, année(s)) en y incluant des substances appelées « agents stabilisants ». Ces substances peuvent être soit des émulsifiants soit des agents de texture (McClements, 2005).

Les émulsifiants sont des molécules tensioactives capables de s'adsorber à la surface des gouttelettes lipidiques nouvellement formées au cours de l'homogénéisation. Ils agissent en réduisant la tension de surface des gouttelettes et en formant une interface protectrice qui empêche leur rapprochement et leur fusion éventuelle (Dickinson, 1992 ; McClements, 1999 ; McClements, 2005). Les émulsifiants sont des molécules amphiphiles qui diffèrent entre eux

par leur caractéristiques moléculaires et physicochimiques. Les émulsifiants les plus utilisés dans les industries agroalimentaires sont les protéines et divers tensioactifs de faible masse moléculaire. Les tensioactifs peuvent être zwitterioniques comme les lécithines (E-322), non ioniques (MAG et DAG-E 471 et leurs esters acétique-E 472a et lactique-E 472b, tween-, polysorbates-E 432-436, esters polyglycériques d'acides gras/PGE-E 475, esters de saccharose et d'AG, …), ou anioniques (sels d'acides gras-E 470, sels de stéaroyl lactylate-E 481 et 482, …).

Les agents de texture sont des substances qui augmentent la stabilité des émulsions en limitant le mouvement des gouttelettes lipidiques. Ils peuvent être classés en deux catégories (agents épaississants ou agents gélifiants) en fonction de leur mode d'action et des caractéristiques rhéologiques qu'ils confèrent au système (McClements, 2005). Les agents épaississants sont des ingrédients utilisés pour augmenter la viscosité de la phase continue alors que les agents gélifiants forment un gel dans la phase continue. En industrie agroalimentaire, les agents épaississant et gélifiant les plus utilisés sont les polysaccharides et les protéines.

I-3- FONCTIONS BIOLOGIQUES ET EFFETS SANTE DES ACIDES GRAS

Les acides gras sont les éléments constitutifs des lipides auxquels est attribuée la plus grande part de leurs propriétés nutritionnelles. Tous les AG participent à l'approvisionnement du corps en énergie et à la construction des tissus. Les AG saturés et à chaînes courtes sont les précurseurs biologiques du cholestérol dont les concentrations élevées au niveau plasmatique sont un facteur de risque des maladies cardiovasculaires. Les AGPI par contre ont des fonctions physiologiques plus ou moins bénéfiques vis-à-vis de ces maladies. Ainsi, les AGPI n-3 et n-6 sont des inhibiteurs métaboliques des AGS pour la synthèse de cholestérol et sont les précurseurs de base des eicosanoides que sont les thromboxanes, les prostaglandines, les prostacyclines, les lipoxines et les leucotriènes. Les AGPI n-6 forment des thromboxanes (TXA2) qui sont fortement thrombogènes, alors que les TXA3, moins thrombogènes sont synthétisés à partir des AGPI n-3.

Après la découverte dans les années 30 des acides gras essentiels (LA et ALA) du fait de l'incapacité par les mammifères et l'homme de synthétiser les doubles liaisons en positions 6 et 3 des chaînes carbonées des acides gras (Burr and Burr, 1930 ; Jones and Papamandjaris, 2001), des travaux épidémiologiques (Bang *et al.*, 1976 ; Sinclair, 1956) ont initié l'intérêt toujours croissant, porté aux AGPI n-3. Ces auteurs ont constaté qu'à quantité égale de lipides

consommés, les inuits présentaient un taux de cholestérol sérique, une triglycéridémie et une concentration en VLDL (*very low density lipoproteins* : lipoproteines de très basse densité) plus faibles que ceux des danois, ainsi qu'une fréquence d'infarctus du myocarde 10 fois plus faible. Ils suggérèrent alors que cet effet était lié aux AGPI LC n-3 contenus dans les lipides d'origine marine consommés par les inuits dont l'alimentation était caractérisée par un rapport n-6/n-3 de 1 avec environ 94% des AG n-3 constitués d'EPA et de DHA, plutôt qu'à la quantité totale d'AGPI qui est supérieure chez les danois (n-6/n-3 de 3,7 avec 74% des n-3 étant constitués d'ALA). Il a été par la suite rapporté que la consommation de poisson ou d'huile de poisson contenant de l'EPA et du DHA est associée à la diminution des décès cardiovasculaires contrairement à la consommation d'huiles de moutarde riches en ALA (Breslow, 2006). A la suite de ces travaux, de nombreuses études de cas cliniques, d'intervention et épidémiologiques ont permis de mettre en évidence un très large éventail d'effets santé lié à la consommation de poisson ou à la supplémentation en huile de poisson.

Ainsi, chez l'Homme, après une consommation modérée de poisson (au moins 200 à 400 g de poisson gras/semaine) ou une supplémentation en AGPI n-3 LC (1,8 g d'EPA/jour ou ≈ 1 g/jour d'EPA + DHA, 1:2), ont été observées une réduction significative des risques primaire et secondaire d'arrêt cardiaque et d'évènement coronarien (Siscovick *et al.*, 1995 ; Yokoyama *et al.*, 2007), une réduction des décès par maladies cardiaques ischémiques (Mozaffarian *et al.*, 2003) et une réduction significative de la mortalité subite et par causes cardiovasculaire ou coronarienne chez des patients ayant survécu à un infarctus du myocarde (Burr *et al.*, 1989 ; GISSI-Prevenzione Investigators, 1999 ; Marchioli *et al.*, 2002). Les facteurs de risque du syndrome métabolique sont également fortement diminués après une supplémentation de l'alimentation en huile de poisson. Il a ainsi été observé une réduction de 27 à 45 % du cholestérol plasmatique, de 64 à 79 % des triglycérides plasmatiques ainsi que de la concentration plasmatique en VLDL chez des patients hypertriglycéridémiques (Phillipson *et al.*, 1985 ; Harris *et al.*, 1990) consommant 10 à 17 g/j d'AGPI n-3. De plus l'EPA semble protéger de l'athérosclérose par compétition métabolique avec l'acide arachidonique pro-agrégant et du fait de la production de prostacycline PGI_3 à activité anti-agrégante (Dyerberg *et al.*, 1978). D'autres travaux ont montré que la consommation fréquente de poisson conduit à une diminution du risque de développer une maculopathie chez les séniors (Smith *et al.*, 2000). Des effets positifs ont également été observés dans le cas de maladies dégénératives. Ainsi, une supplémentation en EPA (180 mg) et DHA (120 mg) conduit-elle à l'augmentation de l'acuité visuelle à 6 mois de séniors atteints de dégénérescence maculaire sèche (Cangemi, 2007). Des études prospectives, comme celle effectuée sur 1475 chinois ont également montré

qu'une supplémentation en AGPI n-3 était significativement associée, après 18 mois, à la réduction du déclin cognitif chez des sujets de plus de 54 ans (Gao *et al.*, 2011). Les études aboutissant à attribuer aux AGPI n-3 des effets bénéfiques sont ainsi extrêmement nombreuses. Cependant, certaines études, nombreuses également, ne montrent aucun effet de la consommation de poisson (Gao *et al.*, 2011) ou d'une supplémentation en huile de poisson (Innis and Friesen, 2008 ; Dangour *et al.*, 2010 ; Quinn *et al.*, 2010 ; Kwak *et al.*, 2012). Ce dernier cas est généralement rencontré lors des études d'intervention pour lesquels les périodes d'étude sont relativement courtes (2 à 24 mois) comparés aux études de cas ou épidémiologiques qui sont effectuées sur des périodes bien plus longues.

Des étutes de supplémentation (4 g/jour d'EPA ou DHA) ont montré que certains des effets bénéfiques de cardioprotection et vasodilatation ou relatifs à la maladie d'Alzheimer ou à d'autres pathologies, semblent plus liés aux effets du DHA qu'à ceux de l'EPA (Mori *et al.*, 2000 ; Morris *et al.*, 2003 ; Fetterman and Zdanowicz, 2009). Enfin, si l'EPA et le DHA, sont les AGPI LC les plus étudiés en raison de leur prévalence dans les aliments, d'autres AGPI n-3 LC pourraient posséder des fonctions biologiques importantes. C'est ainsi que l'acide docosapentaénoïque (DPA) inhibe plus efficacement l'agrégation plaquettaire que l'EPA et le DHA. Il possède également des propriétés de migration cellulaire endothéliale 10 fois plus importante que celles de l'EPA (Kaur *et al.*, 2011).

Ces effets, ainsi que de nombreux autres, ont également été observés sur des modèles animaux. Chez les rongeurs et le chien, une alimentation enrichie en n-3 protège des facteurs de risque du syndrome métabolique (1,5 g/jour d'EPA + DHA) (Kasbi Chadli *et al.*, 2012) et empêche les fibrillations ventriculaires fatales (perfusion de 1 - 10 g d'AGPI, 58% EPA : 42% DHA) (Billman *et al.*, 1997). Chez les rongeurs, la déficience en AGPI n-3 altère la neurogenèse embryonaire (Coti Bertrand *et al.*, 2006), alors que la supplémentation en AGPI n-3 a des effets neuroprotecteurs (Högyes *et al.*, 2003 ; Lonergan *et al.*, 2004). De nombreuses études ont également montré des effets anticancéreux (Gonzalez *et al.*, 1993 ; Rose *et al.*, 1995 ; Wu *et al.*, 2005). Ainsi, la croissance (en volume et en masse) de carcinome mammaire humain, implanté chez des souris est inhibée de façon dose dépendante par une alimentation riche en AGPI n-3 LC. Des tests de supplémentation (180 mg d'EPA et 120 mg de DHA/jour) ont également montré que le DHA est crucial pour le développement et le maintien d'une bonne mémoire d'apprentissage (Chung *et al.*, 2008). Il pourrait avoir des propriétés protectrices contre la production et l'accumulation de protéine β-amyloïde et des pathologies qui en découlent, dont la maladie d'Alzheimer (Lim *et al.*, 2005).

Pour être utilisés à ces fins par l'organisme, les AG doivent être absorbés. Or, le déroulement du processus de digestion à l'origine de l'absorption est fonction de la forme sous laquelle les AG sont apportés par les aliments.

I-4- ASPECTS GÉNÉRAUX DE LA DIGESTION DES LIPIDES CHEZ L'HOMME

Les aliments sont les substances habituellement ingérées, à l'état naturel ou après cuisson, par les êtres vivants. Ils fournissent à l'organisme les matières et l'énergie nécessaires à sa vie et à son développement (encyclopédie Larousse). Les aliments peuvent être soit des produits directement ingérables issus de l'agriculture, des denrées transformées ou des produits formulés. Les cellules ne peuvent pas extraire les ressources dont elles ont besoin pour leur fonctionnement directement des aliments. Après ingestion, les aliments subissent à différents niveaux du tube digestif une série de transformations. Celles-ci ont pour but de convertir l'aliment brut, constitué de macromolécules et de nutriments non bioaccessibles, en molécules simples absorbables appelées nutriments : c'est la digestion. La digestion est un processus complexe de fragmentations mécaniques et chimiques des aliments en nutriments. Les nutriments se définissent comme des molécules organiques ou substances minérales simples, assimilables en l'état sans avoir à subir des étapes de dégradation digestive supplémentaires. Les nutriments, libérés dans le tractus gastro-intestinal, sont absorbés puis distribués aux cellules de l'organisme par les systèmes sanguin et/ou lymphatique. Ils permettent d'assurer le fonctionnement de l'organisme. Les principaux nutriments sont l'eau, les sucres simples (oses), les acides gras, les acides aminés, les vitamines et les minéraux. Les constituants non digérés ou absorbés sont rejetés dans les fèces. En fonction de la nature des aliments consommés, du sexe et de l'âge, le processus digestif dure entre 24 et 72 heures (Metcalf *et al.*, 1987 ; Proano *et al.*, 1990 ; Degen and Phillips, 1996).

I-4-1- Anatomie, compartimentation

La digestion des aliments est réalisée par le système digestif (Fig. 6), lequel peut être scindé en deux grandes parties : les organes du tube digestif et les organes digestifs annexes.

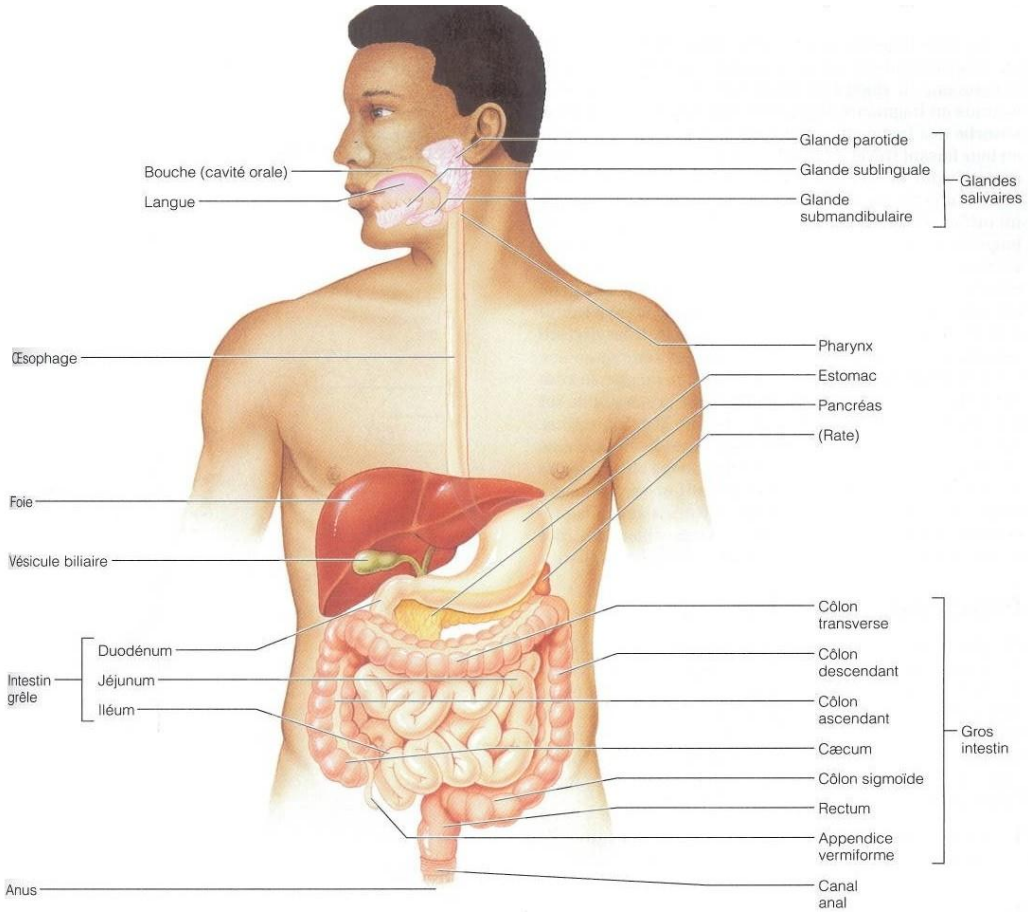


Figure 6 : Anatomie du système digestif (Marieb, 1999)

Le processus digestif se déroule en plusieurs étapes : l'ingestion, la propulsion, la digestion mécanique, la digestion chimique, l'absorption et la défécation (Marieb, 1999).

L'ingestion est l'introduction par la bouche de l'aliment dans le tube digestif. La propulsion représente le processus mécanique par lequel l'aliment se déplace dans le tube digestif. Elle comprend la déglutition, le péristaltisme et la segmentation.

La digestion mécanique consiste à réduire et séparer les aliments plus ou moins compacts et complexes en petites particules, plus facilement accessibles aux enzymes. Les actions mécaniques qui se produisent tout au long du TGI assurent le brassage des aliments avec les sucs digestifs, ainsi que leur progression le long du tube digestif. Elles comprennent la mastication (mélange des aliments et de la salive sous l'action des dents et/ou de la langue) réalisée au niveau de la bouche, la déglutition contrôlée par le pharynx et qui permet le passage du bol alimentaire dans l'œsophage, le pétrissage/brassage des aliments dans

l'estomac avec le suc gastrique grâce aux contractions musculaires (péristaltisme) et la segmentation (contractions rythmiques et locales de l'intestin permettant de mélanger le bol alimentaire aux sucs digestifs et d'accroître les contacts entre le bol alimentaire et la paroi intestinale).

La digestion chimique, dont l'action se situe au niveau moléculaire, consiste principalement en la dégradation par hydrolyse enzymatique des molécules alimentaires en molécules simples absorbables par les microvillosités intestinales. Ce phénomène débute dans la bouche pour les glucides, il se poursuit dans l'estomac et est presque terminé à la sortie de l'intestin grêle.

L'absorption quant à elle représente le passage des produits finaux de la digestion (acides aminés, acides gras et monoacylglycérols, oses, …) et des nutriments non digestibles (minéraux, vitamines et eau) de la lumière intestinale vers le milieu intérieur (sang et/ou lymphe). Le principal site d'absorption est l'intestin grêle, toutefois certains organes tels l'estomac et le colon peuvent également être des sites d'absorption.

La défécation représente l'évacuation hors de l'organisme des substances, apportées par les aliments ou issues de l'organisme lui même, non digérées, non digestibles ou qui n'ont pas été absorbées. Ces déchets sont éliminés sous forme des fèces au niveau de l'anus.

De manière générale, les processus digestifs se déroulent principalement dans la bouche, l'estomac et l'intestin grêle où se produit également l'essentiel de l'absorption des nutriments. De ce fait, l'étape colique, qui intervient faiblement dans la digestion et l'absorption des aliments, mais plutôt dans la fermentation digestive et la production de vitamine K par la flore intestinale, est le plus souvent omise dans les modèles *in vitro*. Le tableau I présente les compartiments du tube digestif impliqués dans la digestion et leurs principales caractéristiques chez l'Homme.

Tableau I : Compartiments du tractus digestif et leurs caractéristiques principales chez l'Homme

Compartiments gastro-intestinaux		Dimensions		pH	Temps de résidence	Facteur de dilution	Composition	Action digestive
Bouche		9-18 cm^3		5,4 – 7,8	secondes	10 % (émulsions)	Salive : mucine et enzymes	Fragmentation, émulsification, floculation, coalescence, amylolyse
Estomac		15-25 cm chez l'adulte 50 mL à vide à 4L		pH =1,5 - 3,5 (à jeun) et 5,95-6,72 (en conditions prandiales)	0,5 – 4 heures	Aliments** (368 ml) V0 =200mL Vt =632mL	Suc gastrique	Fragmentation, émulsification, floculation, coalescence, lipolyse et protéolyse
Intestin grêle*	Duodénum	25 cm	Ø ≈ 2,5 cm V ≈ 1 L S = 200 m^2	7 - 9	1 – 24 heures	/	Suc pancréatique Bile FI = 140 mM	émulsification, lipolyse, amylolyse, protéolyse, absorption et déconjugaison des sels biliaires
	Jéjenum	2,5 m						
	Iléon	3,6 m						
Colon		1,5 m; Ø ≈ 7,5 Cm		/	/	/	/	Fermentation des fibres
Références		(Hoebler *et al.*, 1998 ; Marieb, 1999 ; Burton *et al.*, 2005 ; Vingerhoeds *et al.*, 2005 ; Singh *et al.*, 2009); Ferron, 2010 (communication personnelle)						

* *= l'intestin grêle mesure 6-7 m de long dans un cadavre, mais seulement 2 m chez une personne vivante*
** *= le volume de l'estomac est fonction de la quantité d'aliment ingéré*
Rq : le temps de vidange gastrique dépend du contenu calorique du chyme ainsi que de la nature solide ou liquide de celui-ci

Après leur ingestion, les aliments sont dilués par les sécrétions digestives qui créent les conditions physicochimiques favorables à l'action des enzymes digestives.

I-4-2- Les sécrétions digestives

Les sécrétions digestives ont des compositions, caractéristiques physico-chimiques et fonctions digestives différentes. On distingue ainsi en fonction des compartiments du tractus où ils sont secrétés, la salive, le suc gastrique, le suc pancréatique, la bile et le suc intestinal.

I-4-2-1- La salive

La salive est sécrétée dans la bouche principalement par 3 paires de glandes salivaires majeures : les parotides, les submandibulaires et les sublinguales qui sécrètent respectivement 20%, 65% et 7-8% de la salive. Le pourcentage restant de la salive (<10%) est sécrété par des glandes mineures de la muqueuse buccale qui sont dites orales. La salive agit dans la bouche sur la digestion des glucides, la lubrification et la protection de la cavité orale et dans la

perception du goût. Son action se poursuit dans l'estomac où certains de ses constituants peuvent avoir, des activités pro- ou anti-oxydantes (Gorelik *et al.*, 2007). La salive est essentiellement constituée d'eau (97 - 99,5%) et sa composition en matière sèche est fonction de ses conditions de sécrétions. Des études de protéomique ont montré que la salive humaine le contient plus d'un milier de protéines (Denny *et al.*, 2008).

En absence de stimulation, la salive est constituée d'un nombre important de substances organiques dont la ptyaline, les mucines (30 - 500µg mL^{-1} pour la MUC5B), le lysozyme (28,1 mg L^{-1}), les immunoglobulines (IgA majeur : 325,7 mg L^{-1} ; IgG et IgM) et la lactoperoxydase. Elle contient également des électrolytes (phosphates : 5,4 mM ; Na^+ ; Cl^- : 15-25 mM ; Ca^{2+} : 1,5 mM ; Mg^+ ; K^+ ; HCO_3^- : 5 → 40 - 50 mM ; SCN^- : 30 - 1000 µM ; NO_2^- : 60 – 400 µM ; iodure : 0,8 - 1,2 µM) et des déchets métaboliques tels l'urée et l'acide urique (28,7 mg L^{-1}) (Gorelik *et al.*, 2007).

Après stimulation, la composition de la salive est modifiée. Ainsi, les concentrations en lysozyme (44,8 mg L^{-1}) et IgA (215,2 mg L^{-1}) augmentent alors que celle de l'acide urique (11,5 mg L^{-1}) diminue. La production journalière de salive est comprise entre 1000 et 1600 mL avec des débits à jeûn ou en situation non stimulée (0,3 mL min^{-1} en moyenne ; 0,42 ± 0,07 mL min^{-1}) qui diffèrent de ceux en situation prandiale ou stimulée (0,92 ± 0,11 mL min^{-1} ; en moyenne 0,7 mL min^{-1}), contribuant à hauteur de 80-90% à la production de salive (Edgar, 1990). La vitesse de sécrétion de la salive influence également sa concentration ionique et son pH, qui varie de 5,3 (à faible débit) à 7,8 (Marieb, 1999).

I-4-2-2- Le suc gastrique

Le suc gastrique, qui agit principalement dans l'estomac et le segment D1 du duodénum, est un liquide incolore et filant produit au niveau de la muqueuse gastrique par les glandes fundiques et du cardia. Il est caractérisé par son pH faible compris entre 1,5 et 3,5 à jeûn du fait de la sécrétion gastrique d'acide chlorhydrique (Marieb, 1999). Cependant, le pH gastrique évolue au cours des périodes prandiale et postprandiale. Une étude effectuée sur 20 sujets (Kalantzi *et al*, 2006) a montré qu'à jeûn, le pH médian était de 2,4, 20 min après administration d'eau et ne se stabilisait à pH 1,7 qu'après une heure. L'administration d'une solution d'« Ensure Plus® » (pH 6,6) utilisée pour simuler l'état prandial conduit à une élévation du pH gastrique jusqu'à une valeur de 6,4, valeur qui décroit pour atteindre 2,7 après 3,5 heures. Une autre étude effectuée chez 24 sujets a montré qu'à jeûn, le pH gastrique est de 2,9 ± 2,0 (Lindahl *et al.*, 1997) . Chez des sujets de sexe et de tranche d'âges différents, un pH gastrique de 1,7 à jeûn a également été mesuré (Dressman et al. 1990). Ces mêmes

auteurs ont également constaté qu'après ingestion des aliments, le pH gastrique s'élevait jusqu'à une valeur de 6,7 avant de retourner progressivement à la valeur à jeûn moins de 2 heures plus tard. De même, après administration d'un aliment modèle à sept sujets, le pH gastrique passe d'une valeur à jeûn de 1,8 à une valeur maximale de 4 une heure après intubation pour retourner progressivement à une valeur de 2,5 après quatre heures de digestion tandis qu'après administration d'une émulsion à huit sujets, le pH gastrique passait d'une valeur basale de 1,84 - 1,98 à une valeur de 6,1 trente minutes après intubation avant de retourner au niveau basal 3 heures plus tard (Armand *et al.*, 1996 ; Armand *et al.*, 1999).

Le suc gastrique, majoritairement constitué d'eau, est composé de nombreuses protéines plasmatiques (albumine, IgA, IgG et IgM), de lipase gastrique, de pepsine, de mucus, de phospholipides (issus de la desquamation cellulaire), d'haptocorrine, de facteur intrinsèque qui rend possible l'absorption intestinale de la vitamine B12, et parfois de reflux de lipase pancréatique et/ou de sels biliaires. Les ions présents dans ce suc sont majoritairement : le Na^+ (10 - 140 mM); les protons (0 - 150 mM); le Ca^{2+} (0,2 - 2 mM) ; le Cl^- (à concentration maximale de 165 mM); le K^+ (5 - 15 mM) et le HCO_3^- (20 - 70 mM). La production de suc gastrique est comprise entre 1 et 1,5 L par jour avec un débit maximal de 3 mL min^{-1}. Il est à noter que le mucus en solution dans le milieu gastrique n'est pas d'origine gastrique, mais salivaire ou œsophagien, le mucus gastrique ayant pour fonction principale la protection des muqueuses contre l'acidité et l'activité de la pepsine (Meunier *et al.*, 1988).

I-4-2-3- Le suc pancréatique

Synthétisé par les cellules acineuses du pancréas, le suc pancréatique est un liquide d'aspect légèrement visqueux et de pH compris entre 7 et 9 en fonction du débit de sécrétion. Il est constitué de phospholipides, de mucus, d'électrolytes (Na^+ : 154 ± 7 mM ; Ca^{2+} : 1,7 mM ; Cl^- ; K^+ :4,8 ± 0,9 mM ; HCO_3^- : 25 - 170 mM ; Mg^{2+} ; Zn^{2+} ; PO_4^{3-} et sulfates) et de substances organiques dont 90 % sont des protéines enzymatiques dont la concentration totale est estimée à 1 - 10 g L^{-1} en fonction de la stimulation hormonale. Ce sont entre autres l'urée, le glucose, l'acide urique, la lipase pancréatique, la phospholipase A2, les glucosidases (α-amylase, maltase, saccharase), les endopeptidases (trypsine, chymotrypsine, élastase, collagénase et kallikréine), les exopeptidases (carboxypeptidase A et B, leucine amino peptidase), les inhibiteurs trypsiques (de Kazal) et les nucléases. Quotidiennement, chez l'Homme, 1,2 à 4 L de suc pancréatique sont produits et déversés dans le duodénum qui constitue, avec le jéjunum, son site d'action (Meunier *et al.*, 1988).

I-4-2-4- La bile

Dans le foie, le cholestérol est utilisé pour synthétiser les alcools primaires et les acides biliaires « primaires » (acides cholique et chénodésoxycholique). Ces acides synthétisés par le foie contribuent pour environ 80% à la formation des sels biliaires de la bile. Les acides biliaires primaires, et secondaires issus de la déshydrogénation et d'une épimérisation bactérienne iléale, sont utilisés à leur tour pour la production d'acides biliaires conjugués, notamment avec la glycine (sels majeurs) et la taurine, ou avec les sulfates dans le cas des alcools biliaires (Dawson *et al.*, 2006). Enfin, les acides conjugués sont transformés en sels par des ions monovalents (Na^+ et K^+ essentiellement) pour former les sels biliaires.

La bile est produite dans le foie par mélange des sels biliaires, du cholestérol, des électrolytes, des phospholipides, des pigments et des protéines (0,3 – 3 mg L^{-1}). C'est une solution alcaline vert jaunâtre de pH compris entre 7,5 et 8,5. La bile hépatique est constituée à 97 - 98 % d'eau. Elle contient des protéines plasmatiques (albumine, IgA, …) et non plasmatiques (bilipréalbumines et α1-biliprotéine), de la bilirubine– (conjuguée à 99%) qui constitue 15 à 20 % de son poids sec, du cholestérol représentant 10% en moles des lipides biliaires, des phospholipides et des acides et/ou sels biliaires. Les phospholipides, constitués à 96 % de phosphatidylcholine, représentent 20 % du poids sec des lipides biliaires (2 – 8 g L^{-1}). Les acides biliaires, présents à une concentration de 28 - 42 mM sont constitués, en % molaire, de glycocholate (31%), glycochénodésoxycholate (28%), glycodésoxycholate (17%), taurocholate (10%), taurochénodésoxycholate (9%) et taurodésoxycholate (5%). La bile contient également les électrolytes tels que le Na^+ (175 mM), le Cl^- (55 - 107 mM), le Ca^{2+} (6 mM), le Mg^{2+}, le K^+ (6 mM), le HCO_3^- (34 - 65 mM) et le phosphate. La bile hépatique est par la suite stockée dans la vésicule biliaire, dont le volume peut atteindre 40 mL, où elle subit une réabsorption de certains de ses électrolytes et une concentration de l'ordre de 10 fois des autres constituants.

La bile vésiculaire, produite à hauteur de 0,5 à 1 L par jour, est constituée à 84 % d'eau et est composée de Na^+ (220 - 340 mM), Cl^- (1 - 10 mM), Ca^{2+} (25 - 32 mM), Mg^{2+}, K^+ (6 - 10mM), HCO_3^- (0 - 17 mM), acides biliaires (290 - 340 mM), bilirubine (0,5 - 1,0 g L^{-1}), cholestérol (1 - 9 g L^{-1}) et phosphatidylcholines (3,5 g L^{-1}) (Meunier *et al.*, 1988). Elle est déversée à un débit de 1,33 mL min^{-1} dans le duodénum lors du passage du chyme. Les sels biliaires déversés dans le duodénum sont réabsorbés dans l'iléon après absorption des produits de la lipolyse (AGL, MAG, lysophospholipides, …). Dans l'iléon, sous l'action des bactéries intestinales, les sels biliaires sont déconjugués et déshydroxylés en C_7. Ainsi, l'acide cholique

donne l'acide désoxycholique et l'acide chénodésoxycholique donne l'acide lithocholique. L'acide désoxycholique est facilement réabsorbé mais l'acide lithocholique, moins bien réabsorbé est, pour l'essentiel éliminé dans les fèces ; c'est la raison pour laquelle sa concentration biliaire est très faible (Meunier *et al.*, 1988). De manière générale, les acides biliaires sont réabsorbés à 97% et sont ainsi réutilisés par le foie pour la formation de la bile : c'est le cycle entéro-hépatique (Meunier *et al.*, 1988).

I-4-2-5- Le suc intestinal

Le suc intestinal n'est pas comparable aux autres sécrétions digestives dans le sens où il est constitué d'enzymes intestinales non pas libres, mais liées à la bordure en brosse des microvillosités jéjunales. La phase aqueuse dans laquelle baignent ces enzymes a un pH compris entre 7,4 et 7,8. L'organisme humain produit 1 à 2 L de suc intestinal par jour (Marieb, 1999).

I-5- LA DIGESTION DES LIPIDES

La digestion des lipides est un processus enzymatique essentiellement hydrolytique. Dans l'organisme, elle est contrôlée par l'émulsification intestinale, mais également par les lipases digestives responsables de l'hydrolyse des lipides.

I-5-1- Les lipases

Les lipases sont des estérases dont la particularité est de n'être active que sur des substrats insolubles émulsifiés. Elles sont synthétisées à différents niveaux dans le tractus gastro-intestinal et peuvent être classées en fonction de leur lieu de sécrétion ou de la nature de leur activité et/ou de leurs substrats (Duan, 2000).

I-5-1-1- La lipase gastrique humaine (LG) : EC 3.1.1.3

Chez l'Homme, les lipases préduodénales sont constituées presque exclusivement de la lipase gastrique (118 ± 8,8 U g^{-1}), la lipase linguale étant à l'état de trace (0,3 U g^{-1}) (DeNigris *et al.*, 1988). L'hypothèse de la présence d'une lipase linguale dans la salive a longtemps été controversée, bien qu'ayant été génétiquement identifiée et caractérisée. Récemment encore, et même si elle n'a pas été finement caractérisée, une très faible activité lipolytique dirigée contre les TAG a clairement été mise en évidence dans la bouche (Voho *et*

al., 2006 ; Drago *et al.*, 2011) où elle contribuerait à la perception du gras en bouche plutôt qu'au processus digestif en soi (Neyraud *et al.*, 2012).

La lipase gastrique est une protéine de 379 résidus d'acides aminés sécrétée par la muqueuse gastrique. De poids moléculaire 50 kDa, la lipase gastrique humaine native est potentiellement glycosylée par 4 résidus oligosaccharidiques comptant pour 10 - 15% du poids moléculaire de la molécule. Elle est résistante vis à vis des protéases gastriques et possède une large gamme de stabilité vis à vis du pH (1,5 - 8). Son pH optimal d'activité est cependant compris entre 4,5 - 6,5.

Elle est la seule enzyme lipolytique capable de pénétrer la membrane native des globules gras du lait et d'hydrolyser les TAG du cœur lipidique. Elle hydrolyse préférentiellement les AG en position *sn*-3 et *sn*-1, ceux en *sn*-1 étant deux fois moins hydrolysés que ceux en *sn*-3. La lipase gastrique hydrolyse mieux les TAG contenant des AG de longueur de chaînes moyennes (préférentiellement les acides gras ayant entre 8 et 10 atomes de carbone) que les TAG contenant des AG à plus longues chaînes. Les principaux produits d'hydrolyse de la lipase gastrique sont les diacylglycérols (DAG) et les AGL (Singh *et al.*, 2009). La préhydrolyse gastrique des lipides favorise et accélère l'hydrolyse duodénale des émulsions prédigérées.

La lipase gastrique renferme dans sa molécule trois résidus cystéinyl et par conséquent ne peux former qu'un seul pont S-S pour sa stabilité moléculaire. Les protéines peuvent subir lors de leur adsorption aux interfaces des réarrangements conformationnels qui leur permettent d'adopter la conformation thermodynamiquement la plus stable. La lipase gastrique humaine, ne possédant qu'un seul pont S-S, peut facilement subir des réarrangements conformationnels qui affectent sa structure et donc son activité. Enfin, bien qu'active en absence de sels biliaires, la lipase gastrique est soumise à l'action activatrice dose dépendante de ceux-ci.

I-5-1-2- les lipases pancréatiques

Le pancréas sécrète plusieurs enzymes lipolytiques : la lipase pancréatique et son cofacteur la colipase, la lipase stimulée par les sels biliaires (LSSB), la phospholipase A_2 (PLA_2) et les *lipase-related proteins* (protéines structurellement différentes de la lipase pancréatique mais qui possèdent l'activité de celle-ci).

I-5-1-2-1- La lipase pancréatique (LP) : EC 3.1.1.3

La lipase pancréatique est une protéine de 465 résidus d'acides aminés sécrétée dans le duodénum par le pancréas. Elle hydrolyse les TAG et les DAG en 2-MAG et AGL. Son pH optimum d'activité se situe autour de 8 - 9. Elle hydrolyse plus vite les DAG que les TAG, avec une spécificité pour les AG en position *sn*-3 et *sn*-1. L'activité de la lipase pancréatique peut s'exercer en présence ou en absence des sels biliaires. Elle est inhibée pour des concentrations physiologiques de sels biliaires (28-42 mM dans la bile) et de phospholipides (2 – 8 g L^{-1}). Dans ces conditions, l'hydrolyse dépend de la présence de la colipase. En effet, lorsque la concentration en sels biliaires est proche de leur CMC (0,007 – 0,012 M) (Natalini *et al.*, 2007), la lipase pancréatique est inhibée par compétition physique pour l'interface, les sels biliaires entraînant un déplacement de l'enzyme de l'interface. L'adsorption des sels biliaires à l'interface entraîne en effet une augmentation de la pression interfaciale empêchant la fixation de la lipase à l'interface. Dans les conditions physiologiques, l'effet des sels biliaires à leur CMC est contré par la colipase.

La colipase est un cofacteur protéique essentiel pour l'activité de la lipase pancréatique. Ce cofacteur a une structure en forme de trois doigts, constituée à la base d'acides aminés hydrophobes qui forment une zone hydrophobe importante pour la fixation à l'interface lipidique. La colipase est synthétisée comme pro-colipase par les cellules des acini pancréatiques. Elle est activée dans le duodénum par clivage trypsique produisant la colipase et un pentapeptide, l'entérostatine qui inhibe sélectivement la consommation de lipides. La colipase a pour fonction d'ancrer la lipase pancréatique à l'interface lipidique en présence de concentration élevée de sels biliaires. En effet, elle est capable de se fixer au substrat lipidique (interface) et à la lipase en présence et en absence de sels biliaires. Les micelles mixtes d'AG longue chaîne, de phospholipides et de sels biliaires peuvent fixer simultanément la lipase et la colipase (Fig. 7). L'augmentation de la concentration en sels biliaires affecte de deux manières possibles la fixation de la colipase à l'interface. D'une part du fait de l'adsorption compétitive des sels biliaires à l'interface, et d'autre part, du fait de la formation d'un complexe colipase-sels biliaires dans la phase dispersante.

Dans l'intestin, la lipase et la pro-colipase forment un complexe. Sous cette forme, les sites de fixation de la lipase (site de fixation du substrat lipidique) et de la colipase (site de fixation à l'interface lipidique) sont enfouis dans la molécule. Le clivage trypsique de la pro-colipase conduit à des modifications conformationnelles favorisant l'exposition du site de fixation lipidique de la colipase et par ricochet celui de la lipase pancréatique. Le complexe

ainsi activé est conduit à l'interface. Après sa fixation à l'interface par son domaine hydrophobe, la colipase ancre la lipase à l'interface, la lipase subit une modification conformationnelle qui expose le site de fixation, domaine hydrophobe à l'entrée du site actif de l'enzyme : le complexe est dit « ouvert ». L'ouverture du site actif est stabilisée par de nombreuses liaisons (hydrogènes, ioniques) et probablement par la colipase. Le site actif étant « ouvert », le substrat (TAG ou DAG) peut entrer en contact avec le site catalytique.

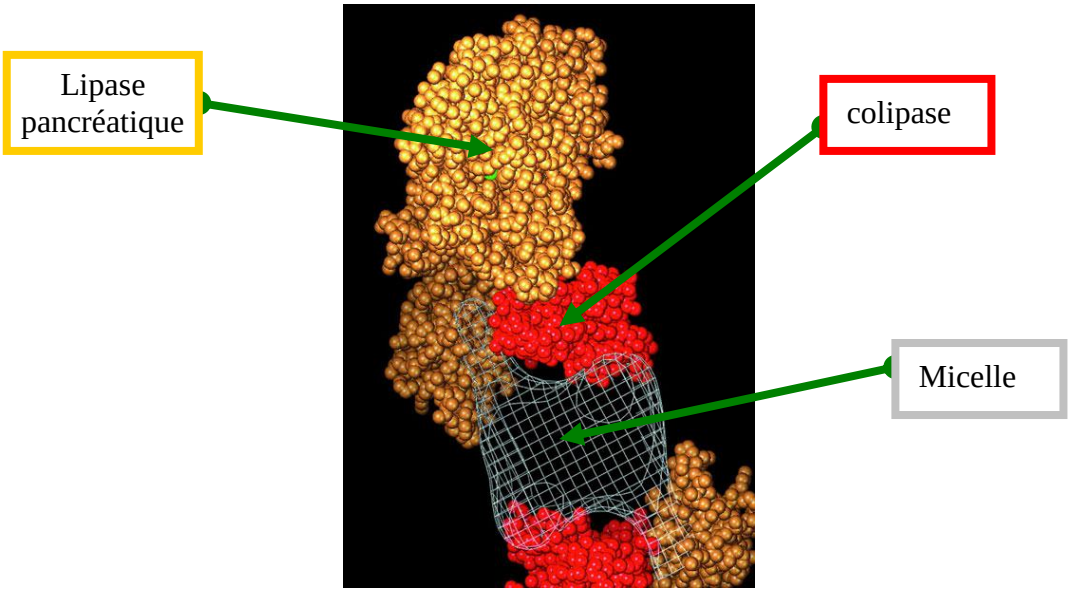


Figure 7 : Complexe lipase pancréatique–colipase–micelle
(http://www.nature.com/emboj/journal/v16/n18/fig_tab/7590528a_F2.html)

I-5-1-2-2- Les protéines à activité lipase pancréatique

Ce sont des protéines ayant une grande homologie structurale avec la lipase pancréatique ; il en existe 2 : les PLRP 1 et 2. Les PLRP 1 et 2 sont exprimées respectivement 4 et 24 fois moins que la lipase pancréatique. A ce jour, aucune activité lipolytique n'a été mise en évidence pour la PLRP 1. La PLRP 2, quant à elle, a une activité lipolytique sur les TAG et ce sur une large gamme de pH. Son activité ne dépend pas des sels biliaires et n'est que peu influencée par la colipase.

I-5-1-2-3- La lipase stimulée par les sels biliaires ou cholestérol estérase : EC 3.1.1.

C'est une glycoprotéine peu spécifique, capable d'hydrolyser de nombreux substrats lipidiques. Ces substrats incluent les TAG, les esters de cholestérol, les phospholipides, les lysophospholipides, les esters de vitamine, les céramides (activité sels biliaires dépendante), les sphingosines et les galactolipides. Chez l'Homme, il existe deux types de LSSB, l'une

sécrétée dans le lait par les glandes mammaires et l'autre sécrétée dans le suc pancréatique par les cellules acineuses pancréatiques. On distingue ainsi la LSSB pancréatique et la LSSB laitière. Mise à part sa faible spécificité vis à vis du substrat, cette enzyme possède des propriétés intéressantes. Sa fixation à l'interface n'est pas inhibée par les sels biliaires et n'a pas besoin de cofacteur. Elle catalyse l'hydrolyse des AG en position *sn*-1, 2, et 3 avec la même activité. Ses produits d'hydrolyse sont les AGL et le glycérol. Toutefois, son efficacité d'hydrolyse diminue lorsque la longueur de la chaîne de l'AG augmente. La longueur de chaîne maximale pouvant être hydrolysée en absence de sels biliaires est de 8. Les LSSB sont spécifiques aux acylglycérols d'AG à chaînes courtes, avec une activité dépendant de la longueur et du nombre de chaîne acyl sur l'acylglycérol. L'activité de la LSSB est influencée par la nature des sels biliaires (primaire, conjugué, …).

I-5-1-3- La phospholipase A_2 (PLA_2) : EC 3.1.1.4

La PLA_2 humaine est constituée d'une chaîne polypeptide unique de 125 acides aminés ayant un PM ~ 14 kDa. La molécule est très stable, du fait de ses 7 ponts S-S. C'est la principale enzyme qui hydrolyse les glycérophospholipides issus de l'alimentation et de la bile. La PLA_2 humaine est sécrétée sous forme de zymogène et activée par clivage trypsique. Elle a une préférence pour les substrats organisés en micelles, vésicules, monocouches ou membranes (agrégat lipidique) trois fois plus élevée que pour les substrats monomériques dispersés. En conditions physiologiques, elle a besoin de Ca^{2+} (cofacteur) et de sels biliaires (pour former les micelles) dans un rapport lécithine/sels biliaires proche de 0,25. Dans l'intestin, sous l'effet de la dilution, il y a transfert des phospholipides des micelles aux vésicules, favorisant l'activité de la PLA_2.

I-5-1-4- La sphingomyélinase et la céramidase

Elles hydrolysent les sphingomyélines (sphingolipides majeurs) et les céramides respectivement.

Les principales informations caractéristiques des lipases, (nature, origine et particularités moléculaires et catalytiques) sont résumées dans le tableau II ci-dessous.

Tableau II : Caractéristiques et propriétés des lipases humaines

Enzymes	Lipase gastrique humaine (LGH) (EC 3.1.1.3)	Lipases pancréatiques				Lipases laitières
		Lipase pancréatique humaine (LPH) (EC 3.1.1.3)	Cholestérol ester lipase [lipase stimulée / activée par les sels biliaires (EC 3.1.1.13)	*Pancreatic lipase-related protein* (PLRP 1 et 2)	Phospholipase A_2 PLA_2 (EC 3.1.1.4)	Lipase stimulée par les sels biliaires (LSSB) (EC 3.1.1.13)
Source	Cellules principales de la muqueuse gastrique du corps de l'estomac	Cellules acineuses du pancréas	Cellules acineuses du pancréas	Cellules acineuses du pancréas	Cellules acineuses du pancréas	Glandes mammaires
Caractéristiques catalytiques	Stable entre pH : 1,5-8 ; pH optimum : 4,5-6,5 ; sensible à la dénaturation par dépliement (1 S-S) à l'interface lipidique et par digestion ; triade catalytique Ser153-His353-Asp324	pH optimum = 8-9 ; plus stable à la dénaturation interfaciale (3 S-S) ;	Elle a besoin des SB pour être active spécialement les SB trihydroxylés. * 2 sites de fixation des SB ; Ser194-His435-Asp320	La PLRP 1 n'a pas d'activité connue mais la PLRP 2 oui		Elle a besoin des SB pour être active spécialement les SB trihydroxylés. *Elle a 2 sites de fixation des SB
Spécificité du substrat	Hydrolyse uniquement les TAG indifféremment de la longueur des AG et a peu d'activité pour les phospholipides et les esters de cholestérol. La vitesse d'hydrolyse de l'AG en position sn-3 est 2 fois supérieure à celle en position sn-1	Hydrolyse les AG estérifiés en positions sn-3 et sn-1 du glycérol	TAG (toute position) ; phospholipides et galactolipides (sn-1 et 2); esters de cholestérol et de vitamines liposolubles ; les céramides ; MAG	Hydrolyse les TAG en position sn-1 et sn-3 (5-10 fois moins que la LPH) et n'a pas besoin de colipase à faible teneur en SB. Galactolipides en position sn-1 et 2 AG estérifiés en sn-1 des phospholipides (avec une faible vitesse) Rétinyls esters	Les AG en position sn-2 des phospholipides	TAG (toute position) ; phospholipides et galactolipides (sn-1 et 2); esters de cholestérol et de vitamines liposolubles ; les céramides ; MAG
Caractéristiques moléculaires	Globulaire ; 379 aa ; glycosylé (50 kDa) ou non (43 kDa) ; 1 S-S	449 aa ; (50 kDa) ; 3 S-S	Glycoprotéine 100 kDa 722 aa		14kDa ; 125 aa ; 7 S-S	722 aa ; (100 kDa)
Taux d'hydrolyse	5-40 % des TAG ingérés	40-70 % des TG ingérés (7,5 % de cette activité dû à la LG)				
Facteurs inhibiteurs	Inhibition par les produits de lipolyse	[Sels biliaires]$_{physiologique}$ et phospholipides (effet levé par la colipase)				
Produits d'hydrolyse	AG et DAG (majeur) et un peu de MAG	AG et MAG				
Sites d'action	Estomac et duodénum supérieur	Intestin grêle	Intestin grêle	Intestin grêle	Intestin grêle	

(Armand, 2007) ; (Duan, 2000) ; (Muthayya, 2002) ; *(Mukhopadhyay and Maitra, 2004)
aa = acides aminés ; SB = sels biliaires

I-5-2- Évolution des lipides dans les différents compartiments digestifs en lien avec leur structure dans l'aliment

Les lipides alimentaires sont ingérés en majeure partie comme éléments constitutifs d'aliments solides ou liquides les contenant ou sous forme de matière grasse 'visible' (huiles et graisses) formant une phase plus ou moins continue. Quelle que soit leur organisation initiale, les lipides subissent au cours de leur parcours dans le tractus gastro-intestinal des

modifications importantes de leur structure à l'échelle colloïdale. Les lipides qui ne sont pas apportés sous forme émulsionnée dans l'aliment subissent, dès les premières phases de la digestion, une émulsification. Cette émulsification se produit à la fois sous l'effet des actions mécaniques et de la présence de tensioactifs présents soit dans les aliments (protéines, polysaccharides, phospholipides, …), soit sécrétés par l'organisme (sels biliaires, phospholipides, enzymes, protéines, glycoprotéines, …), ou issus de la digestion (AGL, mono- et diacylglycérols, protéines hydrolysées) (Bauer *et al.*, 2005). Les lipides initialement apportés sous forme émulsionnée subissent également des réorganisations dont la nature et l'amplitude dépendent de nombreux paramètres liés à l'organisation initiale des lipides et aux conditions rencontrées dans le TGI. Par ailleurs, la fonction première de la digestion est la libération des espèces absorbables que sont les AGL et les 2-MAG pour les lipides, en vue de leur assimilation. En fonction de l'état physiologique (nouveau-né, individu sain ou ayant un système digestif fragilisé), le processus de lipolyse et les contributions relatives des différentes enzymes lipolytiques au processus global ne sont pas les mêmes. Ainsi, chez les nouveau-nés qui sécrètent de faibles quantités de lipase pancréatique et de sels biliaires, l'essentiel de la digestion des lipides est assuré par la lipase gastrique. Chez des individus atteints de certaines pathologies, en particulier chez les patients atteints de mucoviscidose ou de pancréatite chronique, les enzymes pancréatiques et les niveaux de sécrétion biliaire sont très faibles. L'essentiel de l'activité lipolytique est donc assuré par la lipase gastrique.

Nous nous sommes focalisés dans ce qui suit sur les conditions rencontrées dans le cas d'individus adultes sains. Nos travaux portant spécifiquement sur le devenir dans le TGI des modèles d'aliments que sont les émulsions, les exemples choisis porteront plus spécifiquement sur les travaux réalisés dans la littérature sur ce type de systèmes.

I-5-2-1- Évolution des structures des lipides dans la bouche

Juste après leur ingestion, les aliments sont mélangés dans la bouche à la salive aqueuse qui les dilue ; le pH, la force ionique et la température changent ; les aliments et leurs composants interagissent avec les enzymes salivaires, ils sont soumis à des forces de cisaillement sous l'influence des traitements mécaniques mettant en jeu les dents et les muscles linguaux et buccaux (Singh *et al.*, 2009). Le temps de séjour des aliments en bouche varie de quelques secondes pour les aliments liquides comme les émulsions à plusieurs dizaines de secondes pour les aliments solides. Ce temps de séjour est suffisant pour convertir les aliments solides en une masse amollie et agglutinée, prête à être déglutie (bol alimentaire).

Selon la température de l'aliment avant ingestion, la température au sein de ce bol alimentaire augmente ou diminue en bouche pour avoisiner la température corporelle. A l'issue de cette étape, c'est à dire au moment où l'aliment quitte la bouche pour aller dans l'estomac sous l'action de la déglutition et du péristaltisme, les lipides sont plus ou moins dispersés dans une phase aqueuse de composition complexe. La taille des gouttelettes lipidiques du bol alimentaire entrant dans l'estomac dépend donc de l'organisation structurale des lipides dans les aliments (lipides en l'état/lipides de structure/émulsion). Pour les aliments liquides (soupe, lait, boissons lactées), le temps de séjour en bouche est si court que les modifications qu'ils subissent, hormis un effet de dilution et de possibles agrégations sous l'effet des mucines salivaires, sont négligeables comparées à celles qu'ils subiront ultérieurement dans l'estomac ou l'intestin. Nous avons donc considéré pour la suite de ce travail que pour l'étude de la digestion des lipides dans des aliments liquides de type émulsion huile dans eau, nous pourrions dans un premier temps omettre cette étape. C'est d'ailleurs ce qui a été fait dans la majorité des travaux réalisés jusqu'à présent dans la littérature.

I-5-2-2- Évolution dans le compartiment gastrique

Dans l'estomac, les lipides du bol alimentaire sont mélangés au suc gastrique et sont soumis, sous l'action des contractions gastriques, à des processus de malaxage et de brassage. Ils sont exposés à un environnement aqueux acide (2,5 à 6,7 en fonction de l'état prandial et des aliments) et entrent en contact avec les tensioactifs présents dans le suc gastrique (phospholipides, glycoprotéines du mucus ou mucines et protéines). Ces processus ont pour résultat un changement de composition et de d'organisation des lipides initialement présent dans les aliments (Armand *et al.*, 1997 ; Armand *et al.*, 1999 ; Favé *et al.*, 2004 ; Bauer *et al.*, 2005). Dans le cas des matières grasses ingérées en l'état ou constituant initialement une phase continue, l'émulsification amorcée dans la bouche se poursuit conduisant à la formation d'une émulsion grossière et instable. Cette émulsification est favorisée par la présence des tensioactifs endogènes, exogènes ou produits au cours de la digestion (Armand *et al.*, 1994). A ce niveau, se produit également une compétition au niveau des interfaces lipidiques entre les tensioactifs initialement présents à la surface des gouttelettes, les tensioactifs présents dans les aliments ingérés au cours du même repas, et les tensioactifs endogènes (suc gastrique, muqueuse). Ces compétitions conduisent à des modifications de la composition et des propriétés des interfaces des gouttelettes lipidiques.

L'hydrolyse des lipides commence à ce stade : les lipides émulsifiés sont partiellement hydrolysés par la lipase gastrique. Chez l'Homme sain, l'hydrolyse en phase gastrique porte sur 10 à 30% des lipides ingérés, qui sont transformés en DAG et AGL et un peu de MAG (Hamosh, 2000 ; Favé *et al.*, 2004 ; Bauer *et al.*, 2005). Cette hydrolyse gastrique des lipides a pour rôle de faciliter la digestion intestinale des lipides (Armand, 2007). Elle provoque la mise en place d'une relation multidirectionnelle complexe entre la lipolyse et l'émulsification au cours de la digestion. En effet, dans ce compartiment, les gouttelettes lipidiques peuvent subir des phénomènes de floculation et ou de coalescence sous l'action combinée des mucines présentes dans la salive et le suc gastrique, de la pepsine et du pH gastrique. Les mucines présentes dans la salive et le suc gastrique (respectivement à des concentrations de 30 à 500 µg mL^{-1} en fonction du stimulus) initient la floculation des gouttelettes lipidiques (Vingerhoeds *et al.*, 2005). La pepsine par son activité protéolytique altère les films interfaciaux de nature protéique, conduisant à une déstabilisation du système émulsifié. Cette déstabilisation peut se traduire par la floculation et/ou la coalescence des gouttelettes lipidiques. Comme présenté précédemment le pH gastrique évolue fortement au cours des périodes prandiale et postprandiale. Des pH gastriques variant de moins de 2 à 6,7 ont été relevés selon les temps de la digestion. *In vivo*, la lipolyse intragastrique devient significative lorsque le pH du contenu gastrique atteint une valeur proche ou supérieure à 4 (Carrière *et al.*, 1997). En phase prandiale, en neutralisant les charges interfaciales et en annulant ainsi les répulsions électrostatiques entre gouttelettes, le pH peut conduire à la déstabilisation de l'émulsion par agrégation des gouttelettes lipidiques aboutissant à la floculation suivie éventuellement de coalescence. Des études *in vivo* ont montré que, dans l'estomac humain, le diamètre initial des gouttelettes lipidiques modifie leur organisation ultérieure. Ainsi, dans l'estomac, la taille d'émulsions grossières (diamètre de goutte ≥ 10 µm) stabilisées par une lécithine ou des protéines du lactosérum et administrées par sonde naso-gastrique, ne changeait pas, contrairement à celle d'émulsions fines (0,7 µm de diamètre) qui se réarrangeaient en émulsions plus grossières (2,75 - 6,20 µm de diamètre de gouttelettes) (Armand *et al.*, 1999).

Au terme de cette étape digestive, le produit de la digestion gastrique du bol alimentaire appelé le chyme, contenant les lipides ainsi dispersés sous forme de gouttelettes, est propulsé dans l'intestin grêle où se poursuit la digestion. Le temps de demi vidange ($t_{50\%\ in\ vivo}$) d'une émulsion stable en milieu acide a ainsi été estimé à 107-110 min après sa consommation (Marciani *et al.*, 2006 ; Marciani *et al.*, 2009).

I-5-2-3- Évolution dans le compartiment intestinal

Les lipides du chyme acide, partiellement émulsifiés et hydrolysés, sont ensuite mélangés dans le duodénum aux sécrétions pancréatico-biliaires (Pafumi *et al.*, 2002 ; Favé *et al.*, 2004). Ce mélange avec le mucus alcalin de la muqueuse duodénale et le bicarbonate contenu dans les sécrétions pancréatico-biliaires neutralisent l'acidité du chyme dont le pH passe à une valeur de 5,8 à 6,5 pour rester constant pendant au moins 4 à 5 heures après ingestion (Dressman *et al.*, 1990 ; Armand *et al.*, 1996 ; Armand *et al.*, 1999). Par contre, la variabilité inter-individuelle est très élevée et des pH compris entre 6,0 et 7,0 et entre 5,2 et 6,7 selon les études, indépendamment de l'émulsion administrée sont observés. A jeûn, le pH duodénal aurait une valeur médiane de 6,2 (Kalantzi *et al.*, 2006), valeur qui confirme des travaux antérieurs ayant reporté des valeurs comprises entre 6,1 et 6,6 (Evans *et al.*, 1988 ; Dressman *et al.*, 1990 ; Pye *et al.*, 1990). Trente minutes après administration d'un aliment modèle, le pH duodénal médian atteint une valeur de 6,6 (légèrement supérieur au pH à jeûn) avant de diminuer progressivement pour n'être plus que de 5,2 3,5 heures après administration (Kalantzi *et al.*, 2006). Ainsi, en accord avec ces observations, un pH intestinal de 6,5 a été choisi dans de nombreux systèmes de digestion *in vitro,* C'est également ce pH que nous avons choisi pour la simulation du pH intestinal au cours des expérimentations rapportées plus bas.

Parallèlement à cette évolution du pH, il se produit dans le duodénum une compétition entre agents de surface adsorbés à la surface des gouttelettes et les agents de surfaces présents dans ce nouveau milieu de digestion. Le déplacement de certains agents tensioactifs se fait donc au profit de nouveaux, modifiant une fois de plus la composition et les propriétés des interfaces séparant les lipides du milieu aqueux environnant (Kalantzi *et al.*, 2006). Les gouttelettes lipidiques grossières contenues dans le chyme sont émulsifiées plus finement sous l'action des sels biliaires présents dans la bile et des mouvements péristaltiques. Cette émulsification supplémentaire génère de la surface interfaciale supplémentaire, ce qui augmente la surface de contact entre lipides et milieu aqueux et ainsi le nombre de TAG directement exposés aux enzymes pancréatiques, favorisant l'hydrolyse des lipides alimentaires (Marieb, 1999).

La lipase pancréatique, inactivée en présence de sels biliaires, de phospholipides et de protéines aux concentrations physiologiques, est cependant active en présence de la colipase (Lowe, 1997). Ainsi activée, la lipase pancréatique catalyse la libération des AG par hydrolyse des triglycérides aux positions *sn*-1 et 3 produisant ainsi deux acides gras libres et

un 2-monoacylglycerol (Lowe, 2002 ; Carrière *et al.*, 2005). Au fur et à mesure de l'hydrolyse des TAG et des PL par les enzymes lipolytiques, les AGL, MAG et les lysophospholipides sont libérés. Ils sont ensuite captés par la colipase et incorporés aux structures de transport qui vont permettre leur absorption. Ce structures sont les vésicules (uni ou multilamellaires) et les micelles mixtes de sels biliaires et de phospholipides qui les transportent jusqu'aux entérocytes (Hernell *et al.*, 1990 ; Tso, 2000) où ils seront absorbés.

Les structures de transport des lipides absorbables, présents dans les milieux digestifs, ont surtout été étudiées dans des systèmes modèles dans lesquels l'environnement et la complexité des milieux n'est pas prise en compte. Les difficultés rencontrées dans de telles études reposent sur l'aspect dynamique d'un tel système pour lequel toute modification de la composition (dilution, force ionique …) ou de la température sont susceptibles d'induire des transitions, reversibles ou non, entre les structures colloidales présentes que sont les micelles et les vésicules (Egelhaaf and Schurtenberger, 1999 ; Leng *et al.*, 2003). Les études effectuées sur les systèmes modèles ont cependant permis d'avoir des informations sur la taille des micelles et vésicules digestives. Les micelles digestives auraient ainsi une gamme de taille comprise entre 1 et 15 nm correspondant aux micelles primaires et secondaires. Les vésicules possèderaient des dimensions comprises entre plusieurs dizaines de nm et quelques centaines de nm (Cohen and Carey, 1990 ; Hernell *et al.*, 1990 ; Fatouros *et al.*, 2009).

I-5-3- Propriétés des lipides pouvant affecter leur digestion

Certains travaux ont permis de montrer que les propriétés thermiques des lipides alimentaires sont susceptibles d'influencer l'évolution de leurs structures dans le TGI. Ainsi, l'ingestion de lipides formés de TAG d'acide stéarique et dont le point de fusion est supérieur à 37°C conduit à une moins bonne absorption des AG impliqués dans leur constitution (Berry *et al.*, 2007).

Par ailleurs, il a été montré que chez des sujets sains il existe une relation entre la taille des gouttelettes lipidiques et la lipolyse (Armand *et al.*, 1996 ; Armand *et al.*, 1999). Ainsi, la pré-homogénéisation des lipides avant leur ingestion augmente-t'elle l'absorption des AGPI à longue chaîne (Garaiova *et al.*, 2007).

L'activité lipolytique peut être modulée par la composition du milieu digestif. A pH acide, la présence de sérum albumine bovine (SAB) conduit à une lipolyse plus importante (Iverson *et al.*, 1991). Ce phénomène serait lié aux propriétés de fixation et de transport des acides gras de la SAB.

Un effet barrière lié à la composition et à la structure des interfaces huile-dans-eau pourrait également intervenir au cours de la digestion. Il est en effet proposé que certaines molécules adsorbées à l'interface formeraient une couche limitant l'accès des lipases à leurs substrats. Ainsi, la digestion à pH 7 par la lipase pancréatique d'émulsions préparées à pH 3 et stabilisées par la lécithine en présence de sels biliaires est affectée par la présence de chitosane (Mun *et al.*, 2006). Lors de la fabrication de l'émulsion à pH 3, les molécules de chitosane sont cationiques. Elles s'adsorbent par attraction électrostatique à la surface des gouttelettes anioniques stabilisées par la lécithine et y forment un revêtement cationique. Dans ces conditions, la quantité d'acides gras libérée par mL d'émulsion est plus faible dans les émulsions contenant les gouttelettes recouvertes par le complexe lécithine-chitosane (38 ± 16 mmol mL^{-1}) que dans celles contenant les gouttelettes stabilisées par la lécithine (250 ± 70 mmol mL^{-1}) ou recouvertes par le complexe lécithine–chitosane–pectine (274 ± 80 mmol mL^{-1}). Ce revêtement limiterait l'accès des lipases pancréatiques aux lipides contenus dans les gouttelettes, réduisant ainsi leur digestion.

I-6- OXYDATION DES LIPIDES DANS LES ALIMENTS ET AU COURS DE LA DIGESTION

I-6-1- Mécanisme général de l'oxydation des lipides

Les acides gras insaturés du fait de la présence dans leur molécule de doubles liaisons sont hautement réactifs. Ils sont susceptibles de subir une oxydation qui génère, à travers la formation d'hydroperoxydes, de nombreux produits secondaires. Lors des transformations technologiques des aliments, bien que tous les mécanismes impliqués dans le phénomène d'oxydation ne soient pas totalement élucidés, des compétences ont été développées qui permettent de le maîtriser partiellement.

L'oxydation des lipides peut avoir plusieurs voies réactionnelles en fonction du milieu et des agents initiateurs. On peut distinguer l'auto-oxydation catalysée par la température, les ions métalliques et les radicaux libres ; la photo-oxydation, initiée par la lumière en présence de photosensibilisateurs et l'oxydation enzymatique initiée par les lipoxygénases (EC 1.13.11.-) et/ou la cyclooxygénase (EC 1.14.99.1). Toutefois, les produits d'oxydation sont proches et l'oxydation se déroule suivant un mécanisme de réactions radicalaires en chaîne pouvant être subdivisé en trois étapes : l'initiation, la propagation et la terminaison (Frankel, 2005).

INITIATION : elle correspond, en présence d'un initiateur (I= température, ions métalliques, radicaux libres, lumière, peroxydase), à la formation d'un radical lipoyle par perte d'un radical d'hydrogène par les lipides insaturés (LH) (Eq. 1).

$$LH \xrightarrow{I} IH + L° \qquad \text{(Eq. 1)}$$

PROPAGATION : Les radicaux libres formés fixent l'oxygène moléculaire et forment des radicaux libres peroxyles instables (Eq. 2) qui peuvent, par abstraction d'hydrogène, réagir avec une nouvelle molécule d'acide gras et former un hydroperoxyde lipidique et un autre radical alkyle (Eq. 3).

$$L° + O_2 \longrightarrow LOO° \text{ (réaction rapide)} \qquad \text{(Eq. 2)}$$

$$LOO° + LH \longrightarrow LOOH + L° \text{ (réaction lente)} \qquad \text{(Eq. 3)}$$

Les hydroperoxydes formés peuvent se décomposer par scission homolytique de la liaison O-O pour former un radical alcoyle et un radical hydroxyle. Le radical alcoyle réagit avec d'autres substrats et propage la réaction en chaîne. Il peut également subir une scission carbone-carbone de part et d'autre du radical pour former un radical alkyle et un radical vinyle. Le radical alkyle peut réagir avec un hydrogène, un radical hydroxyle ou une molécule d'oxygène générant ainsi des hydrocarbures, des alcools et d'autres hydroperoxydes. Le radical vinyle quant à lui peut réagir avec un radical hydroxyle, un radical hydrogène ou l'oxygène moléculaire pour générer des produits secondaires volatils (adéhydes, alcools, cétones, hydrocarbures, acides, esters) ou non (oxy-monomères/-dimères, epoxydes, ether-oxydes).

TERMINAISON : Au cours de cette étape, les radicaux formés réagissent entre eux pour conduire à un produit non radicalaire qui peut être de l'oxygène moléculaire (Schaich, 2012).

$$LOO° + LOO° \longrightarrow [LOOOOL] \longrightarrow LOOL + O_2 \qquad \text{(Eq. 4)}$$

$$L° + L° \longrightarrow LL \qquad \text{(Eq. 5)}$$

$$LO° + L° \longrightarrow LOL \qquad \text{(Eq. 6)}$$

La suite de cette étude bibliographique a été redigée et présentée sous la forme d'une revue bibliographique qui sera soumise dans la revue *Molecular Nutrition and Food Research*..

I-6-2- (Article 1) Devenir oxydatif des structures lipidiques dans les aliments et au cours de la digestion

Oxidative Fate of Lipid Structures in Food and During Digestion – Possible Metabolic Significance

Genot * C.[1], Kenmogne-Domguia H.B.[1], Michalski M.C.[2],Awada M.[2], Meynier A.[1]

[1] : INRA, UR1268, Biopolymères Interactions Assemblages, BP 71627 –F 44316 Nantes

[2] : INRA USC 1235, INSERM U1060 Cardiovasculaire Métabolisme Diabétologie et Nutrition, bâtiment IMBL, INSA-Lyon, 11 avenue Jean Capelle, 69621 Villeurbanne cedex

*** corresponding author : Phone : 33(0)240675076 ; Fax : 33(0)240675005 ;**

E-mail: claude.genot@nantes.inra.fr

Oxidative Fate of Lipid Structures in Food and During Digestion – Possible Metabolic Significance [1]

Genot * C.[1], Kenmogne-Domguia H.B.[1], Michalski M.C.[2],Awada M.[2], Meynier A.[1]

[1] : INRA, UR1268, Biopolymères Interactions Assemblages, BP 71627 –F 44316 Nantes

[2] : INRA USC 1235, INSERM U1060 Cardiovasculaire Métabolisme Diabétologie et Nutrition, bâtiment IMBL, INSA-Lyon, 11 avenue Jean Capelle, 69621 Villeurbanne cedex

* corresponding author : Phone : 33(0)240675076 ; Fax : 33(0)240675005 ; E-mail: claude.genot@nantes.inra.fr

List of abbreviation

DHA: 22:6 n-3 or docosahexaenoic acid; GIT: Gastrointestinal Tract; EPA: 20:5 n-3 or eicosopentaenoic acid; MDA: malonaldehyde; 4-HHE: 4-hydroxy-2-hexenal; 4-HNE: 4-hydroxy-2-nonenal

Keywords : dietary lipids, digestion, food, metabolic fate, oxidation

Abstract. *Although excessive lipid consumption should be avoided, dietary lipids are now recognized as having various beneficial nutritional effects, especially regarding the need for a balanced supply in both omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA). Improving the lipid profiles through an increase of PUFA supply also increases risks of (per)oxidation with possible negative consequences for food technological, sensory and nutritional properties. Food lipids exhibit various molecular and supra-molecular structures that interact with the other constituents of the foods. These structures and interactions evolve during processing, storage and digestion. They modulate or induce the formation in the food and in the digestive tract of potentially hazardous molecules. This short review concerns the links between the structures of lipids in foods, their oxidation and the metabolic fate and significance of lipid oxidation products. The actual data concerning: (ii) oxidation of dietary lipids, especially when dispersed as oil-in-water emulsions, during process including digestion, (iii) the absorption of primary and secondary, lipid oxidation (especially hydroperoxides and the two hydroxyalkenals : 4-hydroxy-2-nonenal and 4-hydroxy-2-hexenal) and their consequences on metabolic oxidative stress are briefly summarized. We conclude that innovative food formulations should integrate an adequate structuration of*

[1] Based on an proceedings and conference presented during the 2011 CIGR Section VI International Symposium on Towards a Sustainable Food Chain Food Process, Bioprocessing and Food Quality Management, Nantes, France - April 2011

lipids so that their metabolism could be oriented toward their nutritional benefits, limiting the risks linked to peroxidation of the unsaturated fatty acids in the food and during digestion.

Introduction

Over the past 30 years, omega-3 (n-3) polyunsaturated fatty acids (PUFA), and among them the long-chain PUFA, eicosapentaenoic acid (EPA or C20:5 n-3) and docosahexahenoic acid (DHA or C22:6 n-3), are recognized to be of major importance in human nutrition and disease prevention. Disorders of human health linked to an imbalanced overproduction of eicosanoids derived from omega-6 (n-6) polyunsaturated fatty acids could be, at least in part, counterbalanced by a significant increase of the n-3 PUFA dietary intake. A balanced, n-6/n-3 FA ratio (around 5 according to the recommendations) in the diet may reduce the risk of various life-style diseases. In France, recent daily recommendations for healthy adults account for about 2 g linolenic acid (ALA : C18:3 n-3) and 0.5 g EPA + DHA but in several specific metabolic or pathologic cases higher intake (up to several g EPA + DHA) is proposed [1]. The different ways to re-equilibrate the omega-3 PUFA human intake should be accordingly explored taking into account the actual ways of life, wishes and economic status of the specific populations. One way is the enrichment of formulated foods. The number of omega-3 enriched foods proposed to the consumers has accordingly dramatically increased these last years. It remains that the acceptability and shelf life of these new products is often low due to the frequent, rapid and often unpredictable development of off-flavors, including burp off-flavors, attributed to the formation of lipid oxidation odorant compounds.

The rancid and unpleasant taste/smell of oxidized omega-3 lipids usually prevents the intake of large amounts of lipid oxidation products. It is therefore currently believed that oxidation does not represent a health risk because the food would be rejected before consumption due to unacceptable sensory properties [2]. However it remains unresolved whether chronic intake of small amounts of peroxidation products produced either in the food during its industrial or home processing or during digestion presents a health hazard.

Lipid oxidation and formation of lipid oxidation products in foods during their processing, storage and digestion depend on various parameters, including the molecular structure of the oxidizable species and their organization in the matrix, in interaction with the physico-chemical and environmental conditions that evolve with time, especially in the digestive conditions. Accumulating evidence suggests that dietary oxidized lipids can contribute to the pathogenenis of diseases such as atherosclerosis [3]

This review intends to summarize the actual knowledge and questioning about the links between the structures of lipids in foods, their oxidation before and after ingestion and the metabolic fate and significance of lipid oxidation products.

Oxidation of dietary lipids during food processing and storage

The mechanisms of lipid oxidation reaction has been extensively studied even if some reaction pathways and kinetic aspects of the reaction are not completely elucidated [4]. The autoxidation of lipids is described as an autocatalytic chain reaction that targets unsaturated fatty acids and involves free radicals intermediates. The main primary products of autoxidation, the hydroperoxides are odorless and tasteless. Secondary oxidation products issued from decomposition of hydroperoxides comprises an array of odorant volatile compounds including aldehydes, ketones, alcohols, hydrocarbons,… responsible for the development of off-flavors . Other secondary products of low molecular weight, including malondialdehyde (MDA), hydroxy-alkenals : 4-hydroxy-2(E)-nonenal (4-HNE), 4-hydroxy-2(E)-hexenal (4-HHE) are recognized markers of oxidative stress in vivo where they exert cytotoxic activities [5]. In addition, the decomposition of lipid hydroperoxydes leads to the formation of other compounds of higher molecular weights in which the glycerol backbone is kept (figure 1).

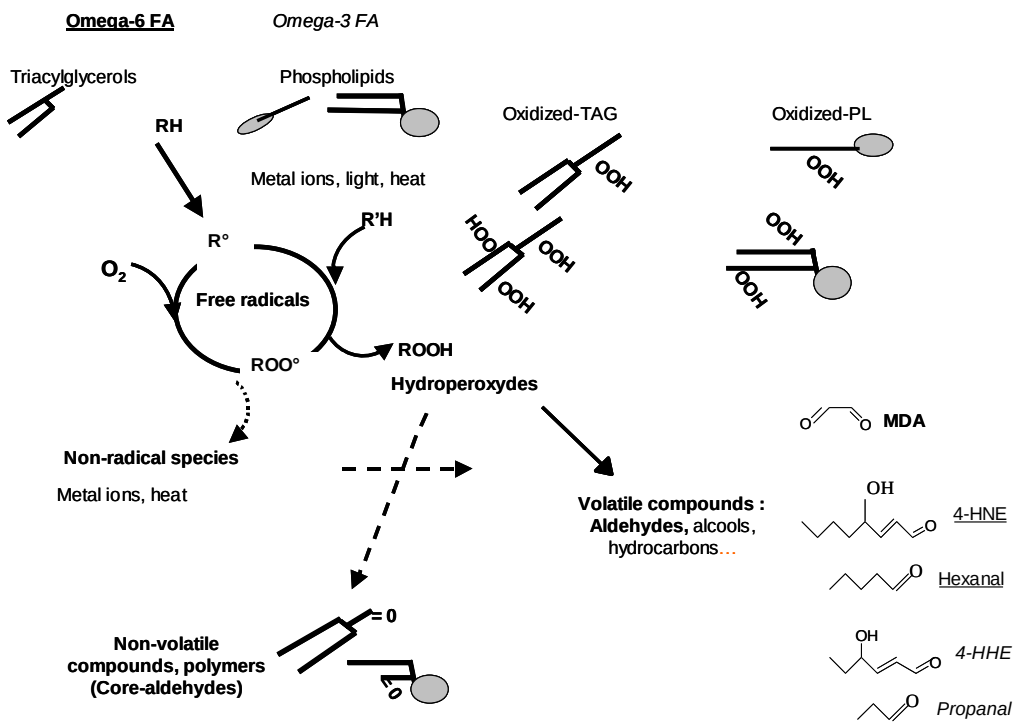


Fig 1 : Molecular diversity of lipid (per)oxidation products

Lipid oxidation products as influenced by the molecular structure of lipids

Due to the high number of lipid molecular species containing unsaturated fatty acids in natural lipids, and the multiple possible reaction pathways per fatty acid, the development of lipid oxidation leads to the formation of a very large array of oxidation products. These products vary in their molecular weight, structure, characteristic chemical function, physico-chemical and biological properties, including their odour. The position of the double bonds on the fatty chain determines the formation of low molecular weight products among them some are characteristic of the fatty acid series; for example, 4-HNE and hexanal for n-6 PUFA, 4-HHE and propanal for n-3 PUFA. By contrast MDA originates from both series and is assumed to arise from the oxidation of PUFA containing at least three double bounds [5]. The molecular structure of the lipids, i.e. free fatty acids, ethyl esters, triacylglycerols and phospholipids as well as the location of the unsaturated FA on the glycerol backbone also influences the oxidation rates. The oxidative stability of DHA was greater in the form of phospholipids, ethyl esters exhibited intermediate stability and TAG the weaker [6, 7].

Oxidability of bulk phase triacylglycerols increases with the global unsaturation of fatty acids. Thus, the addition of low quantities of polyunsaturated oils to vegetable oils decreases the lag phase of lipid oxidation [8]. Inversely, the oxidative stability of vegetable oils containing linoleic or linolenic acid can be improved by the addition of small portion of oils mainly made up with monounsaturated fatty acids such as oleic acid [9-11].

The positional distribution of unsaturated fatty acids on the glycerol backbone can modify their oxidability. Thus TAG containing two adjacent linoleic acid was more prone to oxidation than TAG containing linoleic acid in both external position [12].

Among TAG, DHA was founded to be more stable to autoxidation when located at the sn-2 position of TAG compared to sn-1 (3). This positional effect was more pronounced when DHA was associated with oleic acid than with palmitic acid [13]. In a similar study based on EPA-containing TAG, it has been shown that the oxidative stability of such TAG depended primarily on the moles of EPA in the system. The oxidative stability of EPA appeared similar whatever its position on the glycerol backbone [14]. Structured lipids were designed to improve the technological or nutritional properties of lipids. Generally, their oxidative stability was lower when compared to the original oils. This can be partly related to the loss of endogenous antioxidants during the production of structured lipids [15, 16]. Recently, it was shown that the positional redistribution of fatty acids via enzymatic way in marine oils altered their original oxidative stability even after readjustment of tocopherol content [17].

Factors that influence lipid oxidation in food formulations

Most of food formulations contain lipids as a hydrophobic phase dispersed in a more or less hydrated hydrophilic phase, primarily as oil-in-water emulsions. The emulsification of lipids leads to an increase of the rate of oxidation when compared to bulk oil or biphasic systems [18] especially when oxygen is not the limiting factor for oxidation development.

Time course of lipid oxidation in oil-in-water emulsion results from multistage reactions involving overlapped factors. These main factors involve the droplet size of the emulsions, the nature of emulsifiers and surfactants, the nature of dispersed oil or triacylglycerols, the presence of prooxidants or antioxidants, the composition and structure of the aqueous phase [19-21]. The readers must keep in mind that changing one parameter often results in modification of others, i.e the decrease of the droplet size decreases leads to an increase of the interface area as well as an increase of the amount of absorbed emulsifier and consequently a decrease in the continuous phase. Similarly, modification of protein concentration as emulsifier can modify the concentration of prooxidant compounds such as trace metals contained in the raw materials. Forgetting this can lead to misinterpretation of experimental data. For each of factors, literature give divergent results and therefore it is hard to draw an overall picture of the phenomena. In this review, we have limited the collected data to oil-in-water emulsion containing food grade ingredients. Recently a book chapter reviewed the role of the interfacial layer in oxidation in emulsions [22].

The physico-chemical characteristics of the interfaces [23] and of the aqueous phase [24] greatly influence lipid oxidation. Indeed, the dispersion states, the local environment of the fatty acid chains, either in the hydrophobic core of the fat droplets or at the interfaces and their interactions with antioxidants and pro-oxidants are other important factors [21, 25] and are schematized on figure 2.

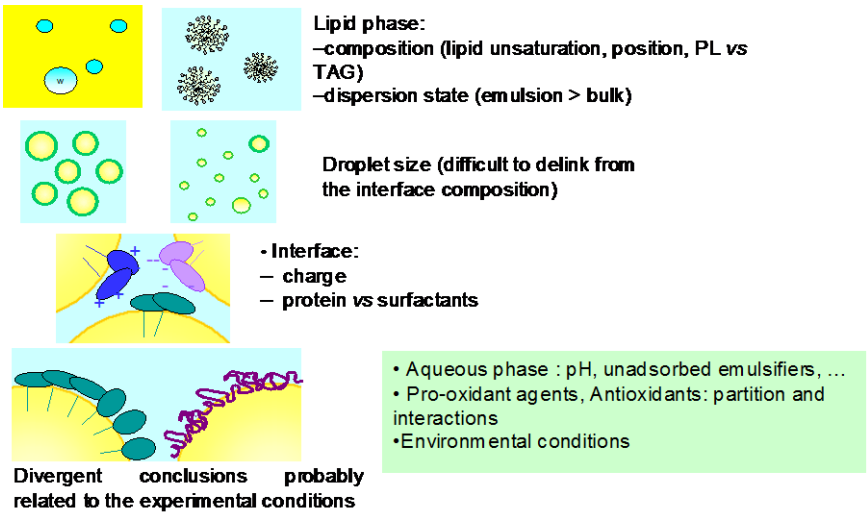


Fig 2: Factors involved in lipid oxidation in dispersed system (with emphasis on emulsion)

Content of lipid oxidation products in foods

Few quantitative data related to the content of hydroperoxides, MDA or 4-hydroxy-alkenals in foods are available. Table 1 collects some of them.

Primary products

There is a broad consensus on the limit quantities of hydroperoxides in oils and fats. It is considered that "fresh" or refined oil should have a peroxide value (PV) below 5 meq O2 kg^{-1}, and that above 10 meq O2 kg^{-1}, the oils were considered rancid [26]. In the collected data, it must be noticed that among the 34 marine n-3 supplements analyzed, only 4 exhibited a PV value above 5 meq O2 kg^{-1}, and one among the 36 vegetable oil exhibited a PV value above 5 meq kg^{-1} [27].

Such agreement does not exist for other lipid-containing foods. Thus, the reported quantity of hydroperoxides quantities in minced and cooked turkey meat was 3.28 ± 0.52 µmoles g^{-1} lipids without special warning [28].

Secondary oxidation products

Concerning the data related to MDA, solely data obtained after HPLC's determination have been collected.

Table 1 : Content of lipid oxidation products of foods

Food	References	Primary compounds	Secondary products		
			MDA	4-HHE	4-HNE
Minced and cooked turkey meat	[28]	3.28 ± 0.52 µmoles HPX g^{-1} TG	1.32 ± 0.22 µmoles g^{-1} TG		
Meat Beef Chicken pork	[29]		 2.29 ± 0.06 nmole g^{-1} 0.44 ± 0.02 nmole g^{-1} 0.55 ± 0.03 nmole g^{-1}		
Fish Cod Sole Salmon	[29]		0.74 ± 0.03 nmole g^{-1} 0.49 ± 0.06 nmole g^{-1} 0.23 ± 0.00 nmole g^{-1}		
Marine n-3 supplements	[27]	1.04-10.83 (median 3.19) PV (meq kg^{-1})		1 alkenals (nmol mL^{-1}) 158.2-932.2 (median 393.9)	
Vegetable oils	[27]	0.6-5.33 (median 2.25)		1 alkenals (nmol mL^{-1}) 33.2-119.0 (median 68.4)	
Corn-Soy oil blend	[30]				~ 2ppm for fresh oil -5.5 ppm for fried oil
Soybean oil (frying)	[31]	0.07meq kg^{-1} oil in unheated oil	2.59 nmole eq MDA g^{-1} oil unheated oil up to 160 nmole eq MDA after 6 hours of heating at 185°C		0 in unheated oil up to 272 nmoles g^{-1}oil after 6 hours heating at 185°C
Butter	[29]		0.16 ± 0.01 nmole g^{-1}		
Margarine	[29]		1.05 ± 0.06 nmole g^{-1}		
Vegetable oil Olive Corn Peanut	[29]		 2.04 ± 0.02 nmole g^{-1} 0.33 ± 0.00 nmole g^{-1} 0.07 ± 0.00 nmole g^{-1}		

Fried soybean oil	[32]				2.8-6.4 µmoles g^{-1} oil
Fried potatoes	[32]				Estimated to 31.4 µmoles $100g^{-1}$ fried potatoes
Soybean oil (continous vs intermittent heating at 185°C	[33]			0-2.62 nmole g^{-1} oil (6 H continuous) 0-5.25 nmole g^{-1} oil (intermittent 6H)	0-19.2 nmole g^{-1}oil (6 H continuous) 0-27.2 nmole g^{-1} oil (intermittent 6H)
Oils and sea foods Corn oil Soybean oil Tuna (canned) Oyster Little neck clam	[34]			 0.94 ± 0.39 nmoles g^{-1} oil 0.56 ± 0.09 nmoles g^{-1} oil 0.16 ± 0.03 nmoles g^{-1} 1.23 ± 0.001 nmoles g^{-1} 1.59 ± 0.09 nmoles g^{-1}	 0.83 ±0.70 nmole g^{-1} 3.19 ±0.92 nmole g^{-1} 0.038 ±0.006 nmole g^{-1} 0.262 ±0.005 nmole g^{-1} 0.35 ±0.04 nmole g^{-1}
PUFA fortified infant formula and commercial food Infant formula Baby food Soymilk Fortified foods	[35]			 Min : 0.342, max: 0.675, median: 0.469 nmole g^{-1} Min: 0, max: 0.456, median: 0.066 Min: 0.011, max: 0.065, median: 0.029 Min: 0.074, max: 0.276, median: 0.138	 Min: 0.288, max : 0.845, median: 0.429 nmole g^{-1} Min: 0.230, max: 0.743, median: 0.371 nmole g^{-1} Min: 0.076 nmole, max: 0.192, median: 0.091 Min: 0.230, max: 1.993, median: 0.393

MDA content of unheated oils and fat ranged from 0.07 nmole in peanut oil to 2.59 nmoles g^{-1} lipids in soybean oil. Surprisingly, one of the highest MDA content was reported in olive oil, whereas it mainly composed of oleic acid which was unable to form MDA upon oxidation [29].

After frying at 185°C for 6H, the MDA content of soybean oil reached 160 nmoles g^{-1} lipids [30] corresponding to 60 fold increase of the initial quantity of MDA.

In raw meat and fish products, MDA ranged from 0.23 nmole g^{-1} in salmon to 2.29 nmole g^{-1} in beef [29]. In cooked meat, MDA reached 1.32 µmole g^{-1} lipids [28].

Human breast milk contained 0.042 ± 0.016 nmole mL^{-1} , whereas in infant formulas the quantities ranged from 0.25 to 1.6 nmole mL^{-1} [36].

Food handling conditions, such as frying, cooking and storage, can yield to large increase of the MDA quantities finally ingested by consumers.

Some data related to the quantities of 4-hydroxy-2-alkenals in oils and foods are now available in the literature. Upon frying, the 4-HHE content of soybean oil increased from 0 up to 5.25 nmoles g^{-1} oil, and the 4-HNE from 0 to 27.2 nmoles g^{-1} oil [33]. Surh et al investigated the daily exposure of Korean consumers to 4-HHE and 4-HNE. They reported that the 4-HHE in oil was lower than 1 nmole g^{-1} oil and reached 1.2 to 1.6 nmole g^{-1} in shell fish [34]. Concerning the 4-HNE, the same study reported up to 3.2 nmoles g^{-1} in soybean oil, whereas the content in shell fish did not exceed 0.35 nmole g^{-1}. Another study achieved by the same authors reported that the 4-HHE content of food (infant formulas, baby foods, fortified foods) did not exceed 0.276 nmole g^{-1} and that of 4-HNE seems to level up close to 2 nmole g^{-1} [35].

A summary of the actual knownledge is presented on figure 3.

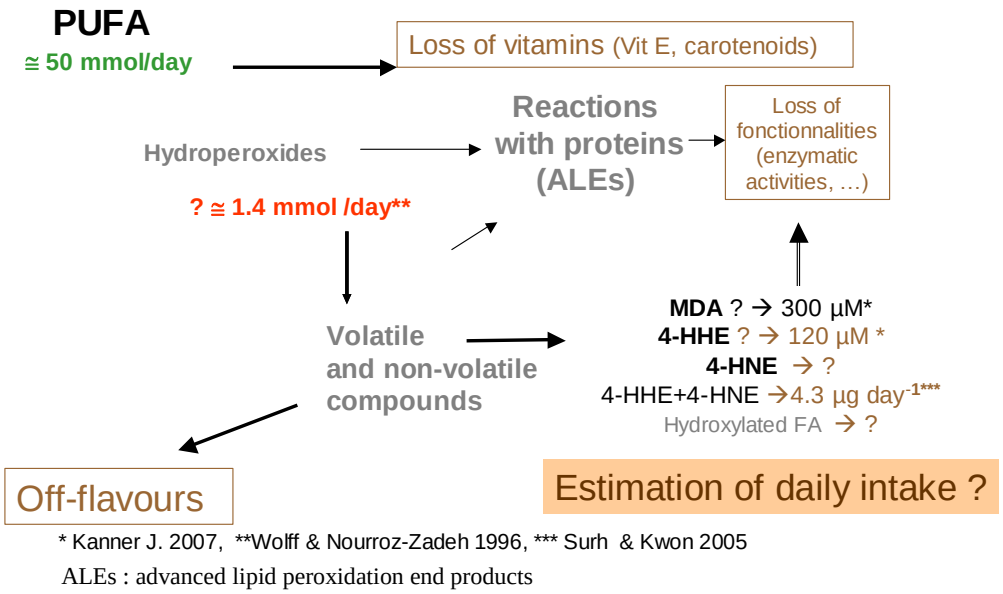


Fig 3 : PUFA and lipid oxidation products in food (intake and consequences)

After reviewing factors that can induce or increase lipid oxidation during the food handling, we will now focus on what is actually known upon the fate of lipid during digestion with emphasis on lipid oxidation.

Oxidative fate of lipids during digestion

When ingested as bulk oils or dispersed in solid or liquid foods, dietary fats are submitted to mechanical, chemical and biochemical processes that make finally the fatty acids bioaccessible through the hydrolysis of the lipid molecules in the gastrointestinal tract (GIT). In fact, some conditions of the digestive environment could either favor the formation of lipid oxidation products or the decomposition of endogeneous products such hydroperoxides.

In-mouth: a primary reorganisation due to mastication and saliva

Saliva secretion, mainly from parotid gland, is stimulated as food is chewed and saliva secretions increases to 1-2 mL min^{-1} [37]. The saliva flow under stimulated conditions can vary from 0.77 to 4.15 mL min^{-1} [38]. A study on 266 healthy adults reported a mean saliva flow of 1.25 ± 0.67 mL min^{-1} [39]. The mixing and dilution of food with saliva can be considered as the first step of the food digestion. It is also postulated that saliva enzymes can initiate fat digestion [40]. This lingual lipase (LL) is produced by von Ebner's gland [41] and hydrolyzes triacylglycerols to release free fatty acids and diacylglycerols [42]. The Human LL has an optimal pH ranging from 3.5 to 6.0 and is stable over a pH range of 1.6 to 8 [42, 43]. Recently, the importance of lipolysis in the oral cavity have been postulated for the

orosensory detection of fat [44]. Beside this sensory aspect, evidence is growing for fat or fatty acid receptor that can signal the presence of fat in mouth further down to the GIT, leading to modification of physiological and hormonal changes preparing the digestion [45-47].

In mouth, the pH, the ionic strength and the temperature change. Destructuration of the food matrices and/or dispersion of bulk fat can be observed. Food and saliva constituents are put into contact under the shear conditions induced by mastication. Both chemical and physical modifications occur. Thus, human parotid saliva exhibits a fatty acid hydroperoxide-reducing ability [48]. Others molecules and enzymes make up the antioxidant system of saliva, of which uric acid and peroxidase, water soluble molecules, are the most important [37]. The lipid-soluble antioxidants may contribute not more than 10% of the total salivary antioxidant capacity [49, 50]. Additionally, some antioxidants (nitrite and thiocyanate) and/or pro-oxidant constituents (lactoperoxidase) of the saliva could exert some activity even when the bolus reaches the stomach [51]. Similarly, it is suggest that oxygen is normally taken up in the stomach when saliva and gastric juice are mixed [52] as the result of the reduction of nitrites by ascorbic acid, both contained in saliva, under the acid conditions of stomach. Beside, these possible chemical modifications of food, physical modifications such as the flocculation of lipid droplets can be induced by the action of salivary mucin [53, 54]. Recently, the adsorption of salivary protein onto the oil-water interface already covered by proteins, b-lactoglobulin or lyzozyme, have been evidenced [55]. Nevertheless, to our best knowledge, consequences of such in-mouth modification of emulsions of their later fate in the GIT have not been investigated.

The stomach: a bio-reactor that may favor lipid oxidation

In stomach, the bolus, composed of the chewed food products ingested during the meal and diluted by saliva in mouth, is mixed with the gastric juice (pH 1-3, fasting conditions). The lipids of the bolus come into contact with endogenous surfactants that lead to great structural reorganizations. Fat are partly hydrolyzed in the stomach by the action of lipase [56-60]. The bulk fat is coarsely emulsified whereas small droplets would partially coalesce under the joint actions of the flocculation induced by mucin, the pepsinolytic activity and the acid pH [61]. The extent of gastric lipolysis ranges from 5 to 40% of ingested triacylglycerols [56, 58, 61, 62]. Lipolytic and pepsinolytic activities generate new surfactant molecules (fatty acids, mono and diglycerides, peptides) which in turn promote emulsification. The increase in exchange surface between lipids and gastric environment, the acidic conditions, the presence of oxygen

and pro-oxidant factors such as dietary iron or heme proteins (myoglobin) from meat products may promote lipid oxidation. Therefore, the stomach can be regarded as a bioreactor favorable to lipid oxidation. [63]. In the physico-chemical conditions of the stomach, oxidation was faster for emulsions stabilized by a protein than by egg phospholipids [64]. Most of the studies aimed to evidence the possible role of dietary antioxidants such as polyphenols in the prevention of the presumed oxidation that can occurred during the gastric step of the digestion [28, 63-65]. Similar studies have been achieved on the antioxidant effect of melanoidins with similar trends [66-68]. Actual data make difficult to settle part of lipid oxidation could be related to the environmental conditions of the stomach (pH, temperature) to that of presence of the gastric fluids. This makes up difficult to gain insight into underlying mechanisms. Furthermore, it must be highlighted that if the proteolysis was taken into account, up to now, the lipolysis during the gastric step of digestion has been ignored. This can be partly explained by the lack of commercially available lipase that can, at least, mimic that of the human gastric lipase (HGL).

In vivo studies have established that dietary hydroperoxides of trilinoleylglycerols were hydrolyzed in the stomach of rat. Hydroperoxides of linoleic acid were released and further decomposed to hydroxyl fatty acid and secondary products such as hexanal and epoxyketones [69]. A further study evidences that the aldehydes, formed in the stomach by decomposition of hydroperoxides, can be partly absorbed into the body of rats [70]. Similarly, phospholipids hydroperoxides are detoxified in Rat gastric mucosa by PLA_2. However, the complete detoxification depends also on the supply of glutathione peroxidase, which seems to be activated by the administration of hydroperoxides [71]. The dietary lipid hydroperoxides that are not decomposed in the gut and circulated into the blood circulation are highly suspected to contribute to the pathogenesis of atherosclerosis [3, 72-74].

If the gastric environment can favor lipid oxidation, scientific data are actually lacking to estimate the possible contribution of the gastric digestion into the overall in vivo oxidative stress.

Duodenum: release and absorption of nutrients and oxidized species

The partially hydrolyzed and emulsified lipids are delivered into the small intestine where they are mixed with pancreatico-biliary and intestinal juices. These juices contain bile salts, phospholipids, pancreatic lipase, colipase, proteases, ion minerals, bicarbonate, among others. It results an alkalinization of the chyme and additional modifications of the lipid interface and lipid structures. Lipolysis, proteolysis and amylolysis are completed. Mixed micelles and

vesicles are formed allowing the absorption of fatty acids and monoglycerides. Unlike the prooxidant gastric environment, the intestinal environment is neutral or slightly basic, of reducing nature and is assumed anaerobic. Nevertheless, a study related to the gastrointestinal tract of pork mentioned value approaching air-saturation in the duodenum and jejunum [75]. Another study on mice reports the existence of a gradient of oxygen concentration from stomach to the colon, with non-zero concentration in the duodenal part of GIT [76]. Several questions can be addressed as regard to lipid oxidation during the intestinal part of digestion: (i) fate of lipid peroxides of dietary origin or formed during the gastric step of digestion (ii) formation of secondary oxidation products such as MDA or Oα,βUA. In this part we will limit reported data to that related to the absorption by intestinal mucosa. The metabolic impact of this absorption will be presented in the following section.

Pancreaticobiliary juice would contain free radical scavengers although other compounds could induce the decomposition of the primary products of lipid oxidation [77].

Thus, in the small intestine, it is generally considered that only secondary step of lipid oxidation could occur. The already present oxidized fatty chains linked to triacylglycerol molecules are hydrolyzed by lipases [71, 78], making the oxidized moiety available for subsequent absorption. Both primary (hydroperoxides) and secondary (hydroxylated FA, hydroxy-alkenals, oxygenated α,β-unsaturated aldehydes (Oα,βUA) products can be absorbed in the intestine [72, 73, 78-80]. Gastrointestinal glutathione peroxidase has been proposed as a barrier against the absorption of dietary hydroperoxides [81].

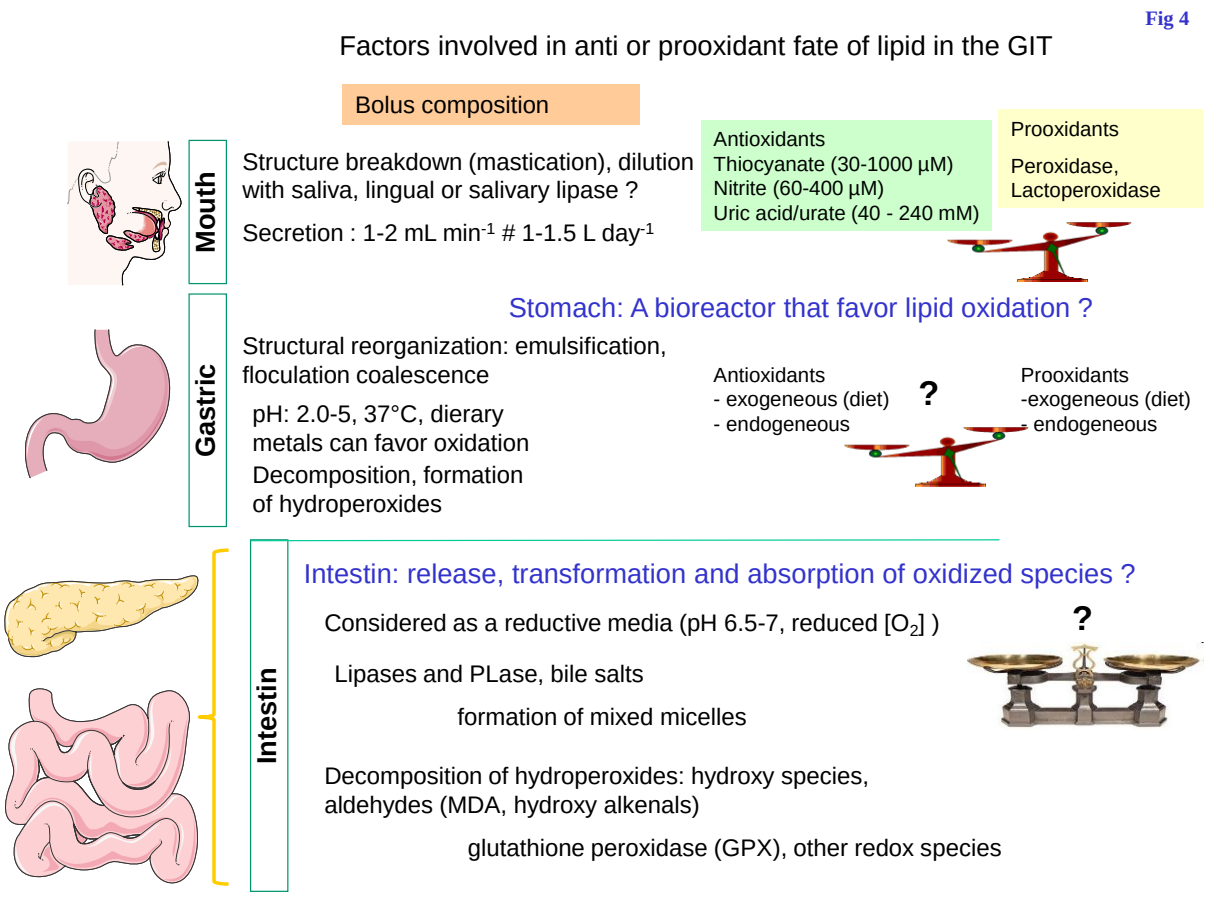


Fig 4: Factors involved in anti or prooxidant fate of lipid in the GIT

Metabolic / health impact of oxidation of dietary lipids

It should be first underlined that if omega-3 PUFA enriched foods are beneficial for the prevention of oxidative stress and inflammation processes, a too high consumption of PUFA n-3 can exert pro-oxidants effects.

From a nutritional point of view, consumption of oxidized lipids in foods is often considered not representing a health risk: the food is assumed to be rejected due to unacceptable sensory properties before a significant decrease of PUFA and other oxidation sensitive nutrients could be registered. However unavoidable small amounts oxidized lipid formed during storage or after ingestion are generally ignored. However, lipid oxidation products may have many biochemical effects [82].

Hydroperoxides: absorption and possible metabolic impact

Hydroperoxides are highly toxic compounds when administered intravenously, but in the body, apart from pathological situations, reactive compounds and hydroperoxides produced in vivo are detoxified by enzymatic cycles involving glutathione peroxidase. Early work

suggested that dietary hydroperoxides does not cross the intestinal barrier and are eliminated in feces. However, the administration to animals, mostly rats, of diets containing oxidized oils caused the development of various pathologies such as cell injuries in different organs, increase of the weight of kidney and liver, modification of the fatty acid composition of adipose tissues, or changes in levels of prostaglandins suggesting an inflammatory response. The administration of vitamin E, antioxidant compounds may in some cases, prevent from these effects. More serious pathologies such as severe irritation of the gastrointestinal tract, diarrhea, and growth delays, even the death of animals, have been noticed with animals fed with high amounts of highly oxidized oils, but the studies suffered of several experimental bias. More recent studies have demonstrated that peroxides compounds can accumulate in the intestinal lumen and contribute to the development of chronic intestinal disorders or diseases such as cancers [83].

Secondary lipid oxidation products

In adult, consumption of diet containing triglycerides including hydroxylated oxidized PUFA led to the presence of these altered fatty acids in chylomicrons within hours after the meal [78]. Alkenals such as 4-HHE and 4-HNE are strongly electrophiles reagents which can easily react with neutrophil groups of proteins, nucleic acids, lipids or with thiols of low molecular weight (e.g. glutathione). When an alkenal reacts with an enzyme, it can alter its biological function. Thus, 4-HHE and 4-HNE are likely to exert deleterious biological effects, those induced by 4-HNE being the most documented. When aldehydes generated from the oxidation of linoleic acid were eaten by rats, oxidation products including 4-HNE were proved to be slowly absorbed by the intestine and accumulated in the liver [69, 70]. The very reactive oxygenated α,β-unsaturated aldehydes (Oα,βUA) were also found to be bioaccessible [79]. 4-HNE exerts pro-oxidant effect in vitro, suggesting that it could contribute in vivo to maintain the "vicious circle" of oxidative stress and its harmful metabolic effects. It could be a mediator between the oxidative stress and the inflammation in adipose cells [84] and could be involved in the activation of in vivo cellular pathways generating a low rate or grade of inflammation of the organism and alter the function of proteins involved in lipid anabolism and suppression of inflammation of adipose tissue [84-86]. 4-hydroxyalkenals could also intervene in the onset of the metabolic syndrome because of their capacity to alter insulin signalization [87, 88].

Conclusions

Regarding the toxicity of lipid oxidation products, it is sometimes argued that high reactivity does not necessarily imply toxicity or damage under physiological conditions because the compounds are often present in small concentrations in the diet. In addition, the organism has powerful defense mechanisms to neutralize and eliminate the reactive compounds, including oxidoreductases, nucleophilic trapping agents, glutathion dependent enzymes, thereby limiting their potential toxicity. Other protective mechanisms include the high turnover and therefore repair rate of gut epithelial cells, and the presence of powerful hepatic and renal detoxification mechanisms [89]. However, dietary lipid oxidation products must attract much attention because of the wide variety of degenerative processes and diseases associated with oxidative stress. It appears that precise data on toxicity thresholds of lipid oxidation products are not available. Our ongoing research project includes in vitro studies of the formation of lipid oxidation products, of the absorption of 4-hydroxyalkenals by Caco-2 cells, a model of intestinal epithelium, and their cellular metabolic consequences, and studies in rodents about the effects of oxidized n-3 PUFA oil consumption on oxidative stress and inflammation.

Acknowledgements: This work was carried out with the financial supports of INRA and Région Pays de la Loire: Ph-D grant of H.B.D-K., and of ANR (French National Research Agency) - program “Alimentation et industries alimentaires – Food and food industry”: ANR-08-ALIA-002 AGEcaninox project for the PhD grant of M.A.

CG and AM participate to the COST action FA1005 Improving health properties of food by sharing our knowledge on the digestive process (INFOGEST).

References

[1] AFSSA, A., Maison-Alfort (F) 2010.

[2] Dobarganes, C., Marquez-Ruiz, G., Oxidized fats in foods. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metabol. Care 2003, 6, 157-163.

[3] Cohn, J. S., Oxidized fat in the diet, postprandial lipaemia and cardiovascular disease. Curr. Opin. Lipidol. 2002, 13, 19-24.

[4] Frankel, E. N. (Ed.), Lipid oxidation, The Oily Press, Bridgwater 2005.

[5] Esterbauer, H., Schaur, R. J., Zollner, H., Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radic. Biol. Med. 1991, 11, 81-128.

[6] Song, J. H., Inoue, Y., Miyazawa, T., Oxidative stability of docosahexaenoic acid-containing oils in the form of phospholipids, triacylglycerols, and ethyl esters. Biosci. Biotechnol. Biochem. 1997, 61, 2085-2088.

[7] Song, J. H., Miyazawa, T., Superior oxidative stability of docosahexaenoic acid-enriched oils in form of phospholipids. J. Food Lipids 1997, 4, 109-117.

[8] Bartee, S. D., Kim, H. J., Min, D. B., Effects of antioxidants on the oxidative stability of oils containing arachidonic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids. J. Am .Oil Chem.Soc. 2007, 84, 363-368.

[9] Anwar, F., Hussain, A. I., Iqbal, S., Bhanger, M. I., Enhancement of the oxidative stability of some vegetable oils by blending with Moringa oleifera oil. Food Chem. 2007, 103, 1181-1191.

[10] Mezouari, S., Eichner, K., Evaluation of the stability of blends of sunflower and rice bran oil. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2007, 109, 531-535.

[11] Torres, M., Lloret, C., Sosa, M., Maestri, D., Composition and oxidative stability of soybean oil in mixtures with jojoba oil. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2006, 108, 513-520.

[12] Neff, W. E., ElAgaimy, M., Effect of linoleic acid position in triacylglycerols on their oxidative stability. Food Sci. Technol.-LWT 1996, 29, 772-775.

[13] Wijesundera, C., Ceccato, C., Watkins, P., Fagan, P., et al., Docosahexaenoic acid is more stable to oxidation when located at the sn-2 position of triacylglycerol compared to sn-1 (3). J. Am .Oil Chem.Soc. 2008, 85, 543-548.

[14] Endo, Y., Hoshizaki, S., Fujimoto, K., Autoxidation of synthetic isomers of triacylglycerol containing eicosapentaenoic acid. J. Am .Oil Chem.Soc. 1997, 74, 543-548.

[15] Martin, D., Reglero, G., Senorans, F. J., Oxidative stability of structured lipids. Eur. Food Res. Technol. 2010, 231, 635-653.

[16] Wang, J. K., Suarez, E. R., Kralovec, J., Shahidi, F., Effect of Chemical Randomization on Positional Distribution and Stability of Omega-3 Oil Triacylglycerols. J. Agric. Food Chem. 2010, 58, 8842-8847.

[17] Wang, J., Shahidi, F., Effect of Enzymatic Randomization on Positional Distribution and Stability of Seal Blubber and Menhaden Oils. J. Agric. Food Chem. 2011, 59, 4232-4237.

[18] Lethuaut, L., Métro, F., Genot, C., Effect of droplet size on lipid oxidation rates of oil-in-water emulsions stabilized by proteins. J. Am .Oil Chem.Soc. 2002, 79, 425-430.

[19] Frankel, E. N., Huang, S. W., Kanner, J., German, J. B., Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants-Bulk oils vs emulsions. J. Agric. Food Chem. 1994, 42, 1054-1059.

[20] McClements, D. J., Decker, E. A., Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. J. Food Sci. 2000, 65, 1270-1282.

[21] Waraho, T., McClements, D. J., Decker, E. A., Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions. Trends Food Sci. Technol. 2011, 22, 3-13.

[22] Genot, C., Berton, C., Ropers, M. H., in: Logan, A., Nienaber, U., Pan, X. M. (Eds.), Lipid oxidation: Challenges in Food Systems, AOCS Press in press.

[23] Berton, C., Ropers, M. H., Viau, M., Genot, C., Contribution of the interfacial layer to the protection of emulsified lipids against oxidation. J. Agric. Food Chem. 2011, 59, 5052-5061.

[24] Villière, A., Viau, M., Bronnec, I., Moreau, N., Genot, C., Oxidative stability of bovine serum albumin and sodium caseinate-stabilized emulsions depends on metal availability. J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 1514-1520.

[25] Genot, C., Meynier, A., Riaublanc, A., in: Kamal-Eldin, A. (Ed.), Lipid oxidation pathways, AOCS, Champaign 2003, pp. 190-244.

[26] Gunstone, F. D., Fatty acid and lipid chemistry, Blackie, London 1996.

[27] Halvorsen, B. L., Blomhoff, R., Determination of lipid oxidation products in vegetable oils and marine omega-3 supplements. Food Nutr. Res. 2011.

[28] Gorelik, S., Ligumsky, M., Kohen, R., Kanner, J., The stomach as a "Bioreactor": when red meat meets red wine. J. Agric. Food Chem. 2008, 56, 5002-5007.

[29] Bergamo, P., Fedele, E., Balestrieri, M., Abrescia, P., Ferrara, L., Measurement of malondialdehyde levels in food by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. J. Agric. Food Chem. 1998, 46, 2171-2176.

[30] LaFond, S. I., Jerrell, J. P., Cadwallader, K. R., Artz, W. E., Formation of 4-Hydroxy-2-(E)-Nonenal in a Corn-Soy Oil Blend: a Controlled Heating Study Using a French Fried Potato Model. J. Am .Oil Chem.Soc. 2011, 88, 763-772.

[31] Seppanen, C. M., Csallany, A. S., Formation of 4-hydroxy-2-trans-nonenal, a toxic aldehyde, in soybean oil at frying temperature. J. Am .Oil Chem.Soc. 2002, 79, 1033-1038.

[32] Seppanen, C. M., Csallany, A. S., Incorporation of the toxic aldehyde 4-hydroxy-2-trans-nonenal into food fried in thermally oxidized soybean oil. J. Am .Oil Chem.Soc. 2004, 81, 1137-1141.

[33] Seppanen, C. M., Csallany, A. S., The effect of intermittent and continuous heating of soybean oil at frying temperature on the formation of 4-hydroxy-2-trans-nonenal and other alpha-beta-unsaturated hydroxyaldehydes. J. Am .Oil Chem.Soc. 2006, 83, 121-127.

[34] Surh, J., Kwon, H., Estimation of daily exposure to 4-hydroxy-2-alkenals in Korean foods containing n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. Food Addit. Contam. 2005, 22, 701-708.

[35] Surh, J., Lee, S. H., Kwon, H., 4-hydroxy-2-alkenals in polyunsaturated fatty acids-fortified infant formulas and other commercial food products. Food Addit. Contam. 2007, 24, 1209-1218.

[36] Michalski, M. C., Calzada, C., Makino, A., Michaud, S., Guichardant, M., Oxidation products of polyunsaturated fatty acids in infant formulas compared to human milk. Mol. Nutr. Food Res. 2008, 52, 1478-1485.

[37] Nagler, R. M., Klein, I., Zarzhevsky, N., Drigues, N., Reznick, A. Z., Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. Free Radic. Biol. Med. 2002, 32, 268-277.

[38] Jenkins, G. N., The physiology and biochemistry of the mouth, Blackwell, Oxford 1978.

[39] Engelen, L., Fontijn-Tekamp, A., van der Bilt, A., The influence of product and oral characteristics on swallowing. Arch. Oral Biol. 2005, 50, 739-746.

[40] Valdez, I. H., Fox, P. C., Interactions of the salivary and gastrointestinal systems .1. The role of saliva in digestion. Dig. Dis. 1991, 9, 125-132.

[41] Hamosh, M., Burns, W. A., Lipolytic-activity of human lingual glands (Ebner). Lab. Invest. 1977, 37, 603-608.

[42] Liao, T. H., Hamosh, P., Hamosh, M., Fat digestion by lingual lipase – mechanism of lipolysis in the stomach and upper small-intestine. Pediatr. Res. 1984, 18, 402-409.

[43] Fink, C. S., Hamosh, P., Hamosh, M., Fat digestion in the stomach – stability of lingual lipase in the gastric environment. Pediatr. Res. 1984, 18, 248-254.

[44] Kawai, T., Fushiki, T., Importance of lipolysis in oral cavity for orosensory detection of fat. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2003, 285, R447-R454.

[45] Bloomgarden, Z. T., Gut hormones and related concepts. Diabetes Care 2006, 29, 2319-2324.

[46] Chalé-Rush, A., Burgess, J. R., Mattes, R. D., Evidence for human orosensory (taste ?) sensitivity to free fatty acids. Chem. Sense 2007, 32, 423-431.

[47] van Aken, G. A., Vingerhoeds, M. H., de Hoog, E. H. A., Food colloids under oral conditions. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2007, 12, 251-262.

[48] Terao, J., Nagao, A., Yuki, H., Itoh, Y., Reduction of fatty-acid hydroperoxides by human parotid-saliva. Lipids 1993, 28, 121-124.

[49] Meucci, E., Littarru, C., Deli, G., Luciani, G., et al., Antioxidant status and dialysis: Plasma and saliva antioxidant activity in patients with fluctuating urate levels. Free Radic. Res. 1998, 29, 367-376.

[50] Moore, S., Calder, K. A. C., Miller, N. J., Riceevans, C. A., Antioxidant activity of saliva and periodontal-disease. Free Radic. Res. 1994, 21, 417-425.

[51] Gorelik, S., Kohen, R., Ligumsky, M., Kanner, J., Saliva plays a dual role in oxidation process in stomach medium. Arch. Biochem. Biophys. 2007, 458, 236-243.

[52] Takahama, U., Hirota, S., Yamamoto, A., Oniki, T., Oxygen uptake during the mixing of saliva with ascorbic acid under acidic conditions: possibility of its occurrence in the stomach. FEBS Lett. 2003, 550, 64-68.

[53] Vingerhoeds, M. H., Blijdenstein, T. B. J., Zoet, F. D., van Aken, G. A., Emulsion flocculation induced by saliva and mucin. Food Hydrocolloids 2005, 19, 915-922.

[54] Vingerhoeds, M. H., Silletti, E., de Groot, J., Schipper, R. G., van Aken, G. A., Relating the effect of saliva-induced emulsion flocculation on rheological properties and retention on the tongue surface with sensory perception. Food Hydrocolloids 2009, 23, 773-785.

[55] Silletti, E., Vitorino, R. M. P., Schipper, R., Amado, F. M. L., Vingerhoeds, M. H., Identification of salivary proteins at oil-water interfaces stabilized by lysozyme and beta-lactoglobulin. Arch. Oral Biol. 2010, 55, 268-278.

[56] Armand, M., Borel, P., Dubois, C., Senft, M., et al., Characterization of emulsions and lipolysis of dietary lipids in the human stomach. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 1994, 266, G372-G381.

[57] Carey, M. C., Small, D. M., Bliss, C. M., Lipid digestion and absorption. Annu. Rev. Physiol. 1983, 45, 651-677.

[58] Carrière, F., Barrowman, J. A., Verger, R., Laugier, R., Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. Gastroenterology 1993, 105, 876-888.

[59] Hamosh, M., Lingual and gastric lipases : their role in fat digestion. Boca Raton, FL:CRC Press 1990, 1-239.

[60] Lairon, D., in: McClements, D. J., Decker, E. A. (Eds.), Designing functional foods. Measuring and controlling food structure breakdown and nutrient absoprtion, Woodhead Publishing, Oxford 2009, pp. 68-93.

[61] Armand, M., Pasquier, B., Andre, M., Borel, P., et al., Digestion and absorption of 2 fat emulsions with different droplet sizes in the human digestive tract. Am. J. Clin. Nutr. 1999, 70, 1096-1106.

[62] Armand, M., Borel, P., Pasquier, B., Dubois, C., et al., Physicochemical characteristics of emulsions during fat digestion in human, stomach and duodenum. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 1996, 271, G172-G183.

[63] Kanner, J., Lapidot, T., The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. Free Radic. Biol. Med. 2001, 31, 1388-1395.

[64] Lorrain, B., Dangles, O., Genot, C., Dufour, C., Chemical modeling of heme-induced lipid oxidation in gastric conditions and inhibition by dietary polyphenols. J. Agric. Food Chem. 2010, 58, 676-683.

[65] Lapidot, T., Granit, R., Kanner, J., Lipid peroxidation by "free" iron ions and myoglobin as affected by dietary antioxidants in simulated gastric fluids. J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 3383-3390.

[66] Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Conte, A., Effect of Dietary Melanoidins on Lipid Peroxidation during Simulated Gastric Digestion: Their Possible Role in the Prevention of Oxidative Damage. J. Agric. Food Chem. 2010, 58, 2513-2519.

[67] Tesoriere, L., Butera, D., Gentile, C., Livrea, M. A., Bioactive components of caper (Capparis spinosa L.) from Sicily and antioxidant effects in a red meat simulated gastric digestion. J. Agric. Food Chem. 2007, 55, 8465-8471.

[68] Verzelloni, E., Tagliazucchi, D., Conte, A., From balsamic to healthy: Traditional balsamic vinegar melanoidins inhibit lipid peroxidation during simulated gastric digestion of meat. Food Chem. Toxicol. 2010, 48, 2097-2102.

[69] Kanazawa, K., Ashida, H., Catabolic fate of dietary trilinoleoylglycerol hydroperoxides in rat gastrointestines. Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism 1998, 1393, 336-348.

[70] Kanazawa, K., Ashida, H., Dietary hydroperoxides of linoleic acid decompose to aldehydes in stomach before being absorbed into the body. Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism 1998, 1393, 349-361.

[71] Miyamoto, S., Dupas, C., Murota, K., Terao, J., Phospholipid hydroperoxides are detoxified by phospholipase A2 and GSH peroxidase in rat gastric mucosa. Lipids 2003, 38, 641-649.

[72] Staprans, I., Rapp, J. H., Pan, X. M., Feingold, K. R., Oxidized lipids in the diet are incorporated by the liver into very low density lipoprotein in rats. J. Lipid Res. 1996, 37, 420-430.

[73] Ursini, F., Sevanian, A., Postprandial oxidative stress. Biol. Chem. 2002, 383, 599-605.

[74] Ursini, F., Zamburlini, A., Cazzolato, G., Maiorino, M., et al., Postprandial plasma lipid hydroperoxides: a possible link between diet and atherosclerosis. Free Radic. Biol. Med. 1998, 25, 250-252.

[75] Hillman, K., Whyte, A. L., Stewart, C. S., Dissolved oxygen in the porcine gastrointestinal tract. Lett. Appl. Microbiol. 1993, 16, 299-302.

[76] He, G. L., Shankar, R. A., Chzhan, M., Samouilov, A., et al., Noninvasive measurement of anatomic structure and intraluminal oxygenation in the gastrointestinal tract of living mice with spatial and spectral EPR imaging. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1999, 96, 4596-4591.

[77] Terao, J., Ingemansson, T., Ioku, K., Yuki, H., Ito, Y., Effects of rat bile-panceratic juice on Fe2+ induced peroxidation of phospholipids. Biosci. Biotechnol. Biochem. 1995, 59, 55-58.

[78] Wilson, R., Lyall, K., Smyth, L., Fernie, C. E., Riemersma, R. A., Dietary hydroxy fatty acids are absorbed in humans: implications for the measurement of 'oxidative stress' in vivo. Free Radic. Biol. Med. 2002, 32, 162-168.

[79] Goicoechea, E., Brandon, E. F. A., Blokland, M. H., Guillen, M. D., Fate in digestion in vitro of several food components, including some toxic compounds coming from omega-3 and omega-6 lipids. Food Chem. Toxicol. 2011, 49, 115-124.

[80] Wilson, R., Fernie, C. E., Scrimgeour, C. M., Lyall, K., et al., Dietary epoxy fatty acids are absorbed in healthy women. Eur. J. Clin. Invest. 2002, 32, 79-83.

[81] Wingler, K., Muller, C., Schmehl, K., Florian, S., Brigelius-Floché, R., Gastrointestinal glutathion peroxidase prevents transport of lipid hydroperoxides in CaCo-2 cells. Gastroenterology 2000, 119, 420-430.

[82] Guéraud, F., Atalay, M., Bresgen, N., Cipak, A., et al., Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. Free Radic. Res. 2010, 44, 1098-1124.

[83] Kanazawa, A., Sawa, T., Akaike, T., Maeda, H., Dietary lipid peroxidation products and DNA damage in colon carcinogenesis. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2002, 104, 439-447.

[84] Zarrouki, B., Soares, A. F., Guichardant, M., Lagarde, M., Geloen, A., The lipid peroxidation end-product 4-HNE induces COX-2 expression through p38MAPK activation in 3T3-L1 adipose cell. FEBS Lett. 2007, 581, 2394-2400.

[85] Grimsrud, P. A., Picklo, M. J., Griffin, T. J., Bernlohr, D. A., Carbonylation of adipose proteins in obesity and insulin resistance - Identification of adipocyte fatty acid-binding protein as a cellular target of 4-hydroxynonenal. Mol. Cell. Proteomics 2007, 6, 624-637.

[86] Russell, A. P., Gastaldi, G., Bobbioni-Harsch, E., Arboit, P., et al., Lipid peroxidation in skeletal muscle of obese as compared to endurance-trained humans: a case of good vs. bad lipids? FEBS Lett. 2003, 551, 104-106.

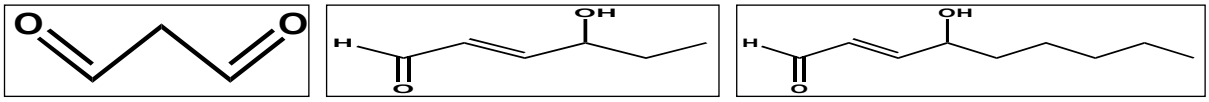
[87] Pillon, N., Zarrouki, B., Lagarde, M., Soulage, C., Alteration of intracellular signaling pathways of insulin in muscle and fat cells by products of lipid peroxidation 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) and 4-hydroxy-hexenal (4-HHE). Diabetes Metab. 2009, 35, A46-A47.

[88] Pillon, N. J., Vella, R. E., Soulere, L., Becchi, M., et al., Structural and Functional Changes in Human Insulin Induced by the Lipid Peroxidation Byproducts 4-Hydroxy-2-nonenal and 4-Hydroxy-2-hexenal. Chem. Res.Toxicol. 2011, 24, 752-762.

[89] Baynes, J. W., Dietary ALEs are a risk to human health-NOT. Mol. Nutr. Food Res. 2007, 51, 1102-1106.

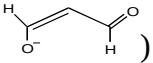
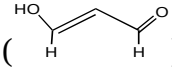
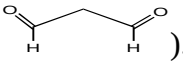
I-6-3- Formation et réactivité de quelques marqueurs biologiques de l'oxydation des lipides

Parmi les produits secondaires issus de l'oxydation des lipides, les 4-hydroxy-2-alcénals ou hydroxyalcénals (HAs) et le malondialdéhyde (MDA) sont ceux qui, du fait de leurs toxicités élevées, ont été les plus étudiés (Esterbauer *et al.*, 1991 ; Esterbauer, 1993 ; Niedernhofer *et al.*, 2003) et sont utilisés comme marqueurs de l'oxydation des lipides *in vivo*. En particulier, les aldéhydes α-insaturé et β-oxygénés (Oα,βUAs) sont impliqués dans la pathogénèse de nombreuses maladies : neurodégénératives, athérosclérose, diabète, stress respiratoire et cancer (Esterbauer *et al.*, 1991).



MDA 4-HHE 4-HNE

Figure 8: Structure chimique du malondialdéhyde (MDA), du 4-hydroxy-2-hexénal (4-HHE) et du 4-hydroxy-2-nonénal (4-HNE)

Le malondialdéhyde résulte de la dégradation oxydative des acides gras polyinsaturés ayant plus de deux doubles liaisons (ALA, EPA, DHA, AA et γ-LA entre autres) (Esterbauer *et al.*, 1991 ; Frankel, 2005). Il peut exister en solution sous plusieurs formes en fonction du pH : la forme la moins réactive est l'anion énolate () espèce majoritaire (>99%) à pH neutre et alcalin dans les conditions physiologiques. A des pH acides (<4,5), le MDA existe principalement sous deux formes tautomériques, la β-hydroxyacroléine () qui est en équilibre avec la forme dicarbonyle (). La réactivité du MDA augmente lorsque le pH diminue. Dans ces conditions, l'espèce prédominante est le β-hydroxyacroléine, composé électrophile qui peut réagir avec les nucléophiles dans des réactions d'addition 1,4 de type Michael similaires à celles des aldéhydes α,β-insaturés (Esterbauer *et al.*, 1991). Il a également été montré que, dans les conditions physiologiques, le MDA est considérablement moins réactif que les aldéhydes α,β-insaturés et que ses réactions avec les groupes α-aminés des acides aminés sont en fait défavorisées (Esterbauer *et al.*, 1991).

Parmi les produits de la peroxydation lipidique, les 4-hydroxy-2-alcénals sont les composants majeurs et sont toxiques vis à vis des cellules (Surh and Kwon, 2003). Les 4-hydroxy-2-alcénals les plus cytotoxiques sont le 4-HHE et le 4-HNE qui proviennent

respectivement des acides gras polyinsaturés de la famille n-3 (acides: α-linolénique, eicosapentaénoïque et docosahexaénoïque) et n-6 (acides: linoléïque, arachidonique et γ-linolénique) (Esterbauer *et al.*, 1990 ; Van Kuijk *et al.*, 1990).

Le 4-HNE est formé par des mécanismes encore mal connus mais qui semble procéder par décomposition des hydroperoxydes issus des acides gras de la famille n-6 tel que l'acide 13-hydroperoxy-linoléïque (13-HPODE) suivant le mécanisme décrit dans la figure 9.

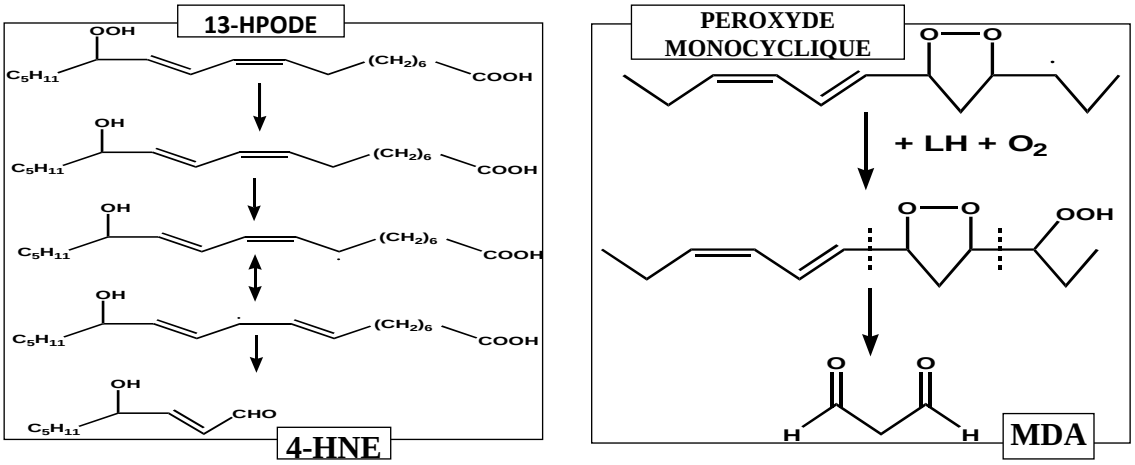
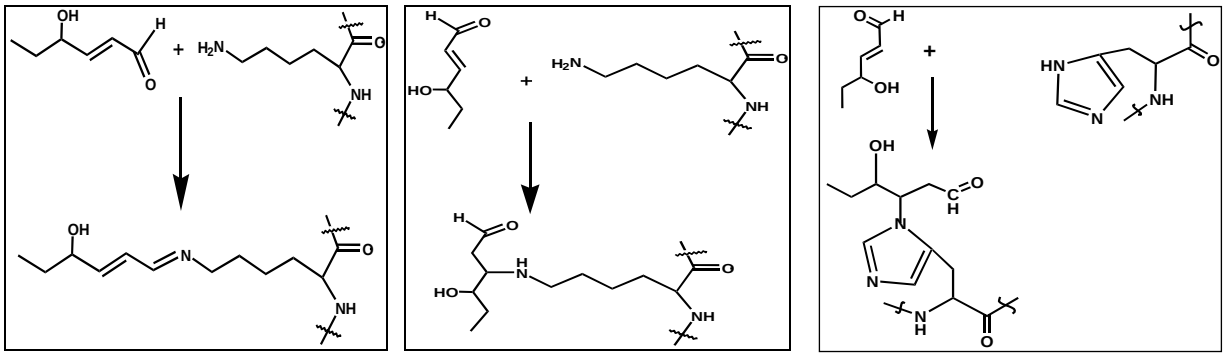


Figure 9: Formation des hydroxyalcénals (A) et du MDA (B)

Le 4-HHE est formé, *a priori*, suivant le même mécanisme mais dans ce cas, par décomposition des hydroperoxydes des acides gras de la famille n-3. En ce qui concerne le MDA, plusieurs précurseurs ont été proposés mais le plus probable et le plus important sur le plan biochimique est le peroxyde monocyclique formé à partir des acides gras ayant plus de 3 doubles liaisons (Fig. 9B).

Les produits secondaires de l'oxydation des AGPI, particulièrement les Oα,βUAs, sont hautement réactifs du fait de la présence dans leur molécule de trois groupes fonctionnels (aldéhyde, alcène et alcool). Cette réactivité se traduit dans l'organisme par des réactions avec les groupements nucléophiles, conduisant à la formation des « bases de Schiff » (*via* la fonction aldéhydique) et des « additions de Michael » (*via* la double liaison β) (Fig. 10).



A **B** **C**

Figure 10 : Réactions impliquant les Oα,βUAs et des résidus acides aminés. A : formation de base de Schiff entre les résidus lysyl et le 4-HHE. B : addition de Michaël entre le 4-HHE et un résidu lysyl. C : addition d'un 4-HHE sur un résidu histydyl.

Ces réactions conduisent à des modifications irréversibles des phospholipides, acides aminés et protéines, ayant pour conséquences une modification de leurs fonctions biologiques. Elles constituent également, dans certaines occasions l'étape initiale de nombreux processus dégénératifs causés chez les humains, par les Oα,βUAs produits de manière endogène ou absorbés de l'aliment (Uchida *et al.*, 2002). Cet effet dépend de la concentration des Oα,βUAs, du type de tissu et du statut physiologique, et peut être aggravé par certaines pathologies. En ce qui concerne le 4-HNE, selon la concentration, on peut distinguer trois types d'effets (Esterbauer *et al.*, 1991). Pour des concentrations supérieures ou égales à 100 µM, on note un effet cytotoxique aigu plus ou moins spécifique conduisant dans la plupart des cas à la mort cellulaire. Dans ces conditions, plusieurs processus cataboliques de base (respiration mitochondriale, ...) et anaboliques (synthèses d'ADN, d'ARN et de protéines) sont inhibés. Pour des concentrations comprises entre 1-20 µM, on note une inhibition de la synthèse de l'ADN et des protéines, une stimulation de la phospholipase C et inhibition de l'expression de la C-myc (protooncogène qui code pour un facteur de transcription qui, si le gène est muté ou surexprimé ne se fixe pas correctement sur le gène cible et cause souvent le cancer). Enfin, pour des concentrations inférieures à 0,1 µM, le 4-HNE a une fonction physiologique importante : stimulation de la migration orientée de neutrophiles, modulation de l'activité de l'adénylate cyclase, stimulation de la phospholipase C et inhibition de la guanylate cyclase. Plus récemment, les toxicités du HHE et du HNE (LD_{50}= 23 et 18 µM respectivement) ont été déterminées sur des cultures de neurones primaires corticales cérébrales (Long *et al.*, 2008). Cette étude a conduit à un épuisement identique du contenu en glutathion (niveaux de toxicité identiques) pour des quantités identiques de 4-HHE et de 4-HNE.

I-6-4- Protection des lipides contre l'oxydation dans les aliments et au cours de la digestion

Dans les aliments, lors des opérations de production et de stockage, l'oxydation des lipides est assez bien maîtrisée au travers de plusieurs stratégies permettant de l'éviter ou de la retarder. Elles consistent d'une part en la limitation de l'utilisation des pro-oxydants ainsi que la limitation des contacts entre pro- et anti-oxydant au cours des opérations de production, de conditionnement et de stockage des aliments qui doivent se faire aux températures les plus basses possibles et à l'abri de la lumière. D'autre part, les aliments peuvent être conditionnés sous vide dans des emballages étanches à l'air et/ou protégés par l'ajout d'anti-oxydants aux aliments. Les anti-oxydant sont des composés qui peuvent protéger les lipides oxydables par des mécanismes variés incluant le contrôle des substrats de l'oxydation (oxygène et lipides), des pro-oxydants (métaux de transition et espèces réactives de l'oxygène) et l'inactivation des radicaux libres, empêchant l'initiation ou arrêtant la propagation (Frankel, 1998). En fonction de leur mécanisme d'action, les anti-oxydants peuvent être regroupés en deux grandes classes que sont les anti-oxydants primaires et secondaires, bien que certains puissent exprimer plusieurs mécanismes d'action (β-carotène et certains polyphénols).

I-6-4-2- les antioxydants primaires

Les antioxydants primaires, encore connus sous le nom d'antioxydants par rupture de chaîne ou encore désactivateurs de radicaux libres, sont des composés qui, en donnant un atome d'hydrogène, permettent de neutraliser les radicaux libres de la chaîne radicalaire au cours du processus d'oxydation tout formant un radical libre stable (beaucoup moins réactif que le radical libre initial). Dans certains systèmes, les radicaux stables d'antioxydant peuvent être régénérés en la molécule initiale par réaction avec des agents réducteurs tel l'acide ascorbique (Packer *et al.*, 1979). Les principaux antioxydants primaires utilisés en industries agroalimentaires sont les tocophérols (α, β, γ et δ), l'acide ascorbique et le 2,6-di-tert-butyl-hydroxytoluène (BHT).

I-6-4-2- les antioxydants secondaires

Les antioxydants secondaires agissent préventivement en évitant la formation des radicaux libres. Certains agissent en décomposant les peroxydes en produits non radicalaires, conduisant ainsi à l'arrêt de la propagation de l'oxydation des lipides. C'est le cas des sulfites, des phosphates, des thioesters et de certaines enzymes telle la glutathion peroxydase. Certains composés tels que les ions métalliques et la metmyoglobine à des concentrations élevées (20 µM) (Kanner and Lapidot, 2001) peuvent également décomposer les peroxydes, mais avec formation de radicaux libres très réactifs susceptibles d'initier la réaction et jouent ainsi un rôle pro-oxydant. Pour protéger les lipides de ceux-ci, il est possible d'utiliser des agents chélateurs tels l'EDTA, de nombreux polyphénols et certaines enzymes (…) (Frankel, 2005). Les désactivateurs de lumière ultraviolette : certains composés, qui peuvent absorber l'énergie lumineuse sans former des radicaux libres, peuvent désactiver les molécules photo-initiatrices de l'oxydation des lipides que sont les hydroperoxydes, les composés carbonylés et l'oxygène singulet. C'est le cas du β-carotène, du squalène et des cétones aromatiques tel l'ortho-hydroxybenzophénone (Frankel, 2005). Les antioxydants peuvent également agir de manière synergique afin de renforcer leur action. On peut ainsi couramment avoir, dans les aliments, la combinaison entre l'acide citrique (chélateur de métaux) et les tocophérols (antioxydant par rupture de chaîne) conduisant à un pourcentage de synergie calculé sur la base du temps de latence (*induction period*) de l'ordre de 285 % (Frankel, 2005).

Le pouvoir antioxydant de ces molécules est fonction de leur localisation dans le système, particularité liée à leurs propriétés physico-chimiques (solubilité ; charge ; caractère hydrophobe, hydrophile ou tensioactif) (Dickinson and McClements, 1995 ; Frankel, 1998 ; McClements and Decker, 2000). Les antioxydants primaires ont une efficacité différente selon qu'on les utilise pour protéger les huiles ou les émulsions de l'oxydation. Cette particularité est fonction de leur caractère hydrophile ou lipophile. Ainsi, dans les émulsions H/E, les antioxydants apolaires/lipophiles qui vont majoritairement s'adsorber à la surface des gouttelettes lipidiques seront plus efficaces. Par contre, pour les huiles se sont les antioxydants polaires qui seront les plus adaptés, car ils doivent diffuser de l'huile vers l'interface huile/air, lieu de la formation des radicaux libres. Ceci suggère que les antioxydants amphiphiles devraient être plus indiqués pour protéger ou retarder l'oxydation des lipides dans les émulsions, car ils auront tendance à se localiser au niveau de l'interface, lieu de l'initiation de l'oxydation. Il est toutefois important de noter que certains anti-oxydants comme l'α-tocophérol, à des concentrations élevées, peuvent avoir une fonction pro-

oxydante car ils sont capables d'induire l'abstraction d'un atome d'hydrogène des hydroperoxydes et ainsi former des radicaux libres (Porter *et al.*, 1995).

II- DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE

L'objectif de ce projet de thèse était de déterminer, *in vitro* si les structures moléculaires, la taille et l'organisation initiale des gouttelettes des lipides alimentaires et leur évolution au cours de la digestion modulent la lipolyse des acides gras insaturés et leur oxydation au cours de la digestion.

Les informations recueillies tout au long de la synthèse bibliographique ont conduit à la mise en place d'une démarche expérimentale à trois niveaux. Le premier niveau consiste en la fabrication d'aliments modèles dans lesquels les lipides, source d'AGPI sont dans des structures moléculaire et supramoléculaire définies. Trois émulsions ont ainsi été conçues :

1. La première, de taille micrométrique, était stabilisée par une protéine et avait un rapport n-6/n-3 inférieure à 2 conformément à certaines récommandations nutritionnelles, mais ne contenait pas d'AGPI LC. Cette émulsion était destinée à l'étude de l'évolution de la taille et de l'organisation des lipides émulsifiés et de la lipolyse au cours de la digestion. Elle a également été utilisée pour la mise en place de l'étude de l'oxydation en conditions de digestion, en s'intéressant notamment à l'effet du raport pro/anti-oxydant de l'aliment et à la composition des milieux digestifs.
2. La deuxième, de taille identique, était également stabilisée par une protéine mais différait de la précédente par son enrichissement en AGPI LC. Cette émulsion nous a permis d'aborder l'impact de la nature et de la composition en acides des lipides sur leur oxydation en cours de digestion.
3. La troisième émulsion avait une composition en AG comparable à la deuxième, mais différait de cette dernière par sa taille et la nature des émulsifiants uilisés. En effet, celle-ci était de taille nanométrique et stabilisé par un mélange de tensioactifs (phosphatidylcholine/Tween80). Cette émulsion devait nous permettre d'aborder la question de l'impact de la nature de l'interface et de la taille des gouttelettes lipidiques dans l'émulsion sur la lipolyse et l'oxydation des lipides.

Les émulsions ainsi fabriquées ont été, dans un second temps, soumises aux conditions de digestion *in vitro* mise en place à partir de données collectées dans la littérature sur la détermination de la bioaccessibilité des molécules lipophiles d'une part et sur les conditions digestives en situation prandiale d'autre part. Pour l'évaluation de l'oxydation, le désir de supprimer, comme dans le tractus digestif après ingestion des aliments, les échanges gazeux entre les environnements digestifs et l'exterieur, a conduit à une adaptation du protocole

initialement développé en système clos, ce qui permettait également d'utiliser la consommation d'oxygène en espace de tête comme marqueur de l'oxydation.

Tout au long de ces protocoles digestifs, des échantillons d'émulsion et de milieux digestifs sont périodiquement collectés pour l'évaluation de la taille et de l'organisation des gouttelettes lipidiques (diffusion de la lumière et microscopie optique), de la lipolyse (HPLC-DDL) après extraction des lipides des milieux et de l'oxydation des lipides. Afin d'avoir une vue plus précise du processus d'oxydation, plusieurs groupes de marqueurs ont été choisis. La consommation des substrats (AGI et oxygène) et des antioxydants (tocophérols), la formation de produits primaires (hydroperoxydes) et secondaires spécifiques (4-HHE et 4-HNE) ou non (MDA) de l'oxydation des AGPI ont ainsi été évalués au moyen de techniques chromatographiques et spectrophotométriques.

En complément, une expérimentation *in vivo* a été réalisée chez la souris. Il s'agissait, après gavage, en présence ou non de metmyoglobine, avec l'émulsion stabilisée par la protéine et contenant des AGPI-LC, d'évaluer les quantités de marqueurs secondaires de l'oxydation des lipides présents dans les contenus digestifs (gastriques, intestinaux) et dans le plasma.

Les figures 11 et 12 résument la démarche expérimentale adoptée lors de ce projet.

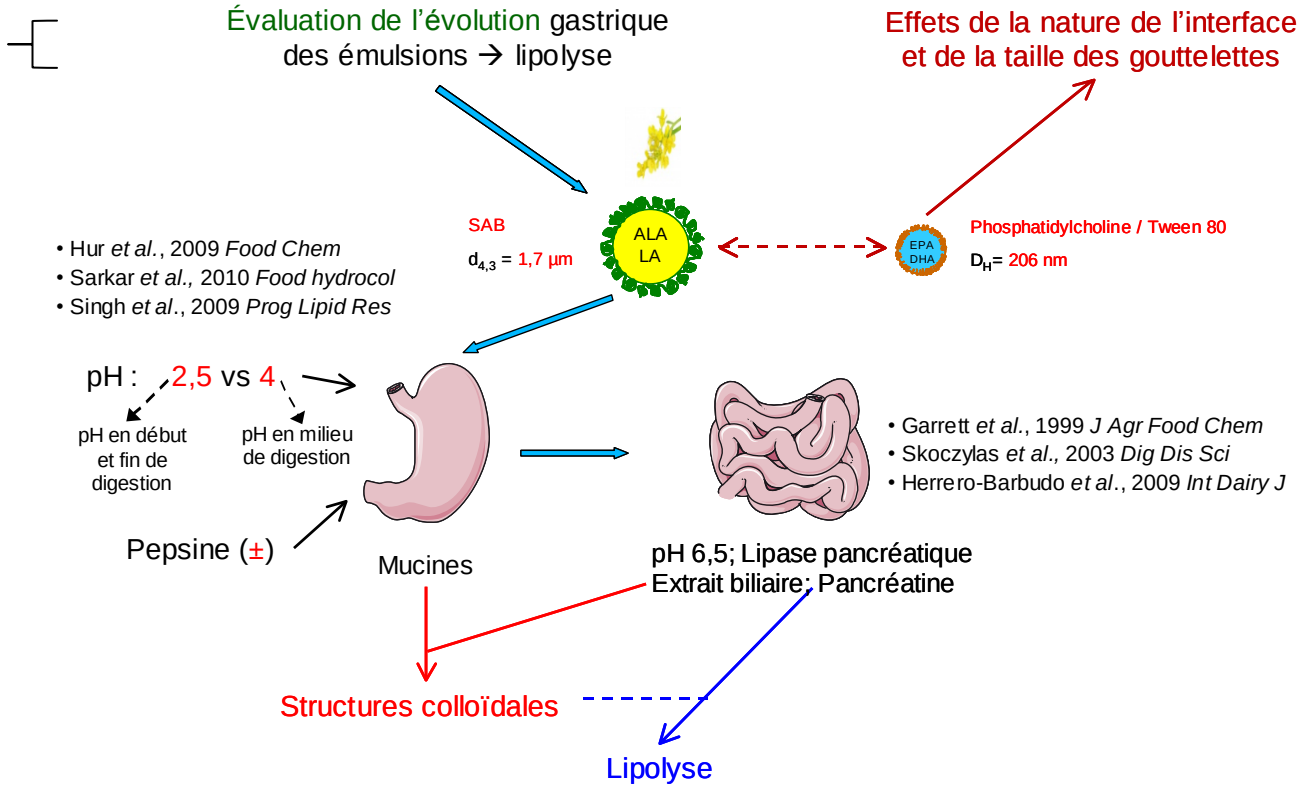


Figure 11 : Représentation schématique de la démarche expérimentale utilisée au cours de l'évaluation des évolutions coloidale et de la lipolyse

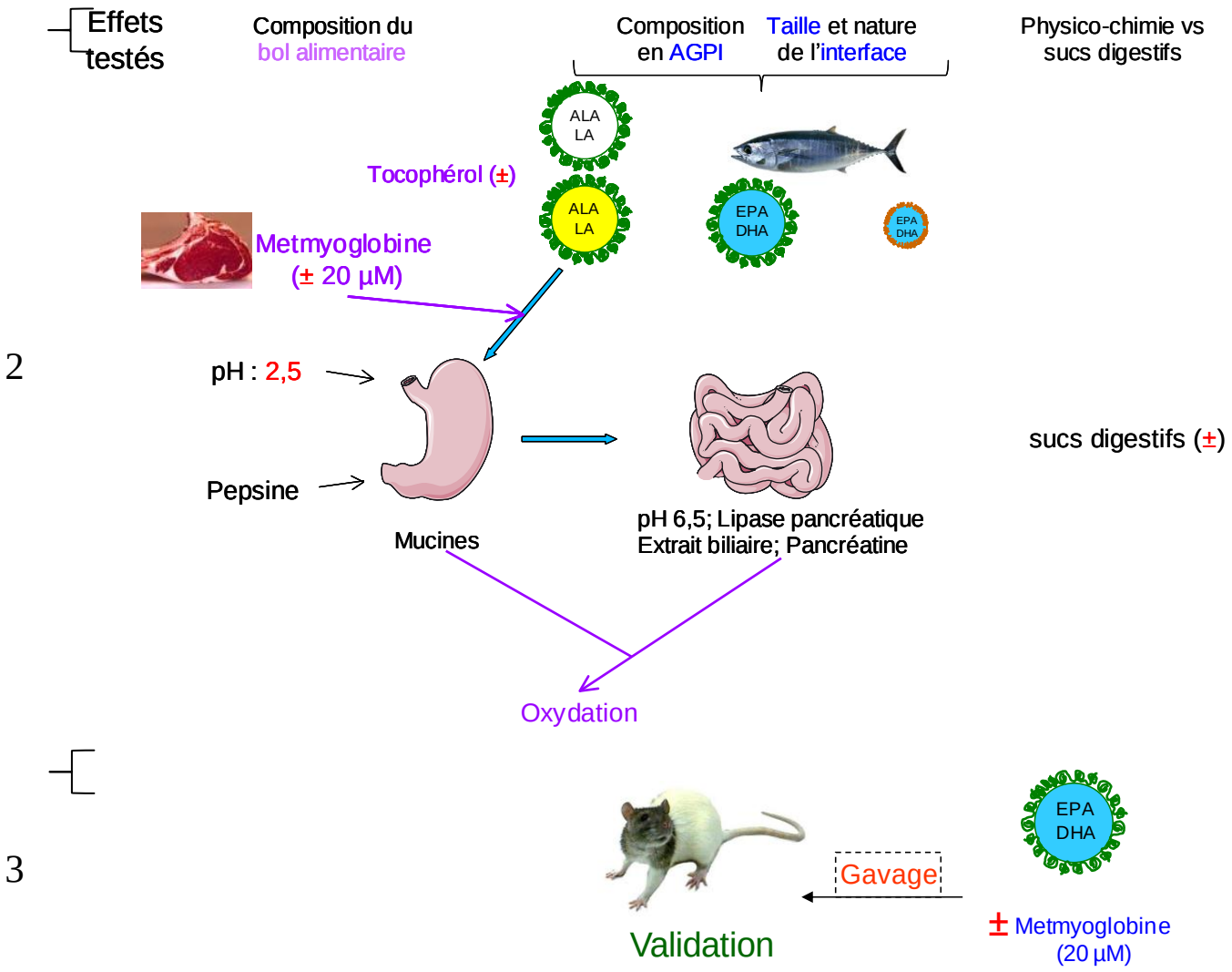


Figure 12 : Représentation schématique de la démarche expérimentale utilisée au cours de l'évaluation de l'oxydation des lipides au cours de la digestion *in vitro* et chez les souris.

III- MATÉRIELS ET MÉTHODES

III-1- MATÉRIELS

III-1-1- Les lipides et émulsifiants

Les huiles

L'huile de colza, de qualité alimentaire (Fleur de colza Lesieur, France), a été achetée en grande surface. L'huile de thon, de qualité alimentaire (Omegavie® flavourless, lot 08703.1) provient de Polaris (Pleuven, France). L'huile de tournesol oléique et l'huile de tournesol ont, quant à elles, été fournies par Olvéa (Marseille St Léonard, France) et Lesieur respectivement.

La composition et les teneurs en acides gras des huiles et des tensioactifs utilisés pour la formulation des mélanges lipidiques destinés à la fabrication des émulsions a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse (Morrison and Smith, 1964). Les caractéristiques des huiles ou mélanges utilisés dans les expérimentations sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau III : Composition en acides gras (% p/p) des huiles et extraits lipidiques des émulsions (n = 3)

Acides gras	Huile de colza	Mélange lipidique « n-3_LC-SAB »	Mélange lipidique « n-3_LC-Tween80-PC »
C14:0	/	2,30 ± 0,58	1,52 ± 0,06
C15:0	/	0,44 ± 0,05	0,49 ± 0,06
C16:0	5,00 ± 0,05	11,18 ± 0,10	12,13 ± 0,18
C18:0	1,56 ± 0,09	4,46 ± 0,01	4,39 ± 0,05
C20:0	0,47 ± 0,02	0,49 ± 0,24	0,32 ± 0,01
C22:0	0,24 ± 0,02	/	0,44 ± 0,02
AG saturés	7,26 ± 0,13	19,06 ± 0,22	19,30 ± 0,27
C14:1	/	0,04 ± 0,02	/
C16:1 n-9	/	0,14 ± 0,01	0,43 ± 0,02
C16:1 n-7	0,21 ± 0,01	1,99 ± 0,06	2,09 ± 0,04
C17:1	/	/	0,43 ± 0,01
C18:1 n-9	61,66 ± 0,15	48,63 ± 1,10	48,35 ± 0,19
C18:1 n-7	/	1,18 ± 0,03	/
C20:1	1,16 ± 0,02	0,68 ± 0,19	0,74 ± 0,01
C22:1	0,27 ± 0,05	0,66 ± 0,01	0,27 ± 0,04
AG monoinsaturés	63,29 ± 0,16	53,43 ± 1,27	52,31 ± 0,23
C16:2	/	/	0,29 ± 0,01
C18:2 n-6	19,14 ± 0,04	8,30 ± 0,24	7,76 ± 0,10
C18:3 n-6	/	/	0,48 ± 0,01
C20:2 n-6	/	0,67 ± 0,86	0,16 ± 0,01
C20:3 n-6	/	0,13 ± 0,09	/
C20:4 n-6	/	1,17 ± 0,03	1,18 ± 0,02
C22:4 n-6	/	/	0,20 ± 0,01
C22:5 n-6	/	/	0,98 ± 0,02
AGPI n-6	19,14 ± 0,04	10,25 ± 0,72	10,77 ± 0,12
C18:3 n-3	10,31 ± 0,04	0,48 ± 0,22	0,26 ± 0,00
C20:3 n-3	/	/	0,12 ± 0,00
C20:4 n-3	/	0,25 ± 0,02	0,24 ± 0,1
C20:5 n-3	/	3,04 ± 0,08	3,05 ± 0,04
C22:5 n-3	/	0,74 ± 0,03	0,81 ± 0,03
C22:6 n-3	/	13,01 ± 0,32	12,86 ± 0,37
AGPI n-3	10,31 ± 0,04	17,26 ± 0,64	17,34 ± 0,43
n-6/n-3	1,86 ± 0,01	0,59	0,62
AGPI	29,45 ± 0,06	27,51 ± 1,06	28,39 ± 0,47
Indice de peroxidabilité*	41,34	143,96	149,64

/ : non détecté

*L'indice de peroxidabilité (IP) est calculé comme suit : (% d'acide monoénoïque x 0,025) + (% d'acides diénoïques x 1) + (% d'acides triénoïques x 2) + (% d'acides tétraénoïques x 4) + (% d'acides pentaénoïques x 6) + (% d'acides hexaénoïques x 8) (Meynier *et al.*, 1999).

Ces données montrent que les formulations nous ont permis d'obtenir d'une part une huile ne contenant pas d'AGPI-LC (huile de colza) et d'autre part deux mélanges lipidiques possédant des compositions et teneurs en acides gras voisines. Dans ces derniers cas, les

AGPI-LC sont apportés par l'huile de thon. Les huiles et mélanges lipidiques ont les mêmes proportions globales d'AGPI, mais des indices de peroxydabité des lipides (Nagyová *et al.*, 2001) et des rapports n-6/n-3 distincts. Ainsi, l'huile de colza contient 1,9 fois plus d'AGPI n-6, constitués uniquement d'acide linoléique, que d'AGPI n-3 essentiellement constitué d'acide α-linolénique. Les mélanges lipidiques formulés avec de l'huile de thon contiennent plus d'AGPI longue chaîne (n-3 et n-6).

Les tocophérols font partie des antioxydants fréquemment présents dans les aliments, soit de manière endogène, soit ajoutés lors de l'élaboration des aliments. Leurs teneurs dans les différents extraits lipidiques et huiles utilisés lors de ce travail sont regroupées dans le tableau ci-dessous.

Tableau IV : Teneurs en tocophérols des huiles des émulsions utilisées

	Teneur en tocophérol (µg g^{-1} d'huile) (n = 3)				
	α-tocophérol	β-tocophérol	γ-tocophérol	δ-tocophérol	**Total**
Huile de colza	210,9 ± 2,5	1 ± 1,0	335,0 ± 3,7	5,9 ± 0,3	552,8 ± 7,0
Huile « n-3_LC-Tween80-PC »	248,5 ± 41,7	4,9 ± 0,3	175,7 ± 14,8	4,7 ± 3,0	497,9 ± 61,9
Huile « n-3_LC-SAB »	228,3 ± 6,3	6,7 ± 0,7	214,0 ± 1,3	84,7 ± 2,2	533,7 ± 2,5

La teneur totale en tocophérols (552 µg g^{-1} lipides) dans l'huile de colza est légèrement supérieure à celle dans les mélanges lipidiques. Initialement, les mélanges d'huiles riches en AGPI contenaient des quantités plus importantes de tocophérols que l'huile de colza. Afin d'obtenir des mélanges d'huiles contenant des quantités similaires de tocophérols, les huiles de tournesol ont été purifiées. Nous avons choisi de ne pas purifier l'huile de thon car sa purification conduisait à une formation importante au cours de ce procédé de MDA. Quelle que soit la nature de l'huile, on peut noter que les espèces majoritaires sont les α- et γ-tocophérols.

Les émulsifiants

Trois émulsifiants ont été utilisés pour stabiliser les différentes émulsions : la sérum albumine bovine (SAB en poudre ; Cohn fraction V, lot 7828J, 95-98%, MP Biomedical), le monooléate de sorbitane polyoxyéthylène (Tween®80; E433; Mw ≈ 1310 g mol^{-1}, Sigma) et la lécithine de soja (Lipoid P100 ; Batch 370821-01/032, Frignestrasse, Allemagne). Cette dernière ne contient que de la phosphatidylcholine et est stabilisée par de l'α-tocophérol.

III-1-2- Les autres produits chimiques

L'eau utilisée au cours des expérimentations était de l'eau ultrapure générée grâce à un dispositif « Millipore ».

Extraits servant à la production des sucs digestifs simulés

La mucine (type 2 d'estomac de porc, lot 019K1222), la pepsine de muqueuse gastrique de porc (Lot 128K7003, 2500-3500 unités/mg protéine), la lipase pancréatique de porc (type II, Lot 096K0747), la pancréatine de pancréas de porc (Lot 088K0763, 8xUSP specification) et l'extrait biliaire de porc (Lot 119K0048) provenaient de Sigma-Aldrich Chemical (Saint- Quentin Fallavier, France). L'extrait biliaire contenait 1–5% d'acide hyodéoxycholique, 0,5–7% d'acide désoxycholique, 0,5–2% acide cholique, 10–15% d'acide glycodésoxycholique et 3–9% d'acide taurodésoxycholique (données fournisseur).

Standards utilisés

Les standards utilisés pour les quantifications sont : trioléine (99,9%, Supelco), 1,2-dioléoyl-rac-glycérol (99,5%, Supelco), 1,3-dioléine (99,9%, Supelco), 1-monooléoyl-rac-glycérol (99,9%, Supelco), acide oléique (99%, Sigma), 2-oléoyl-1-stéaroyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (≈ 99%, Sigma), L-α-lysophosphatidylcholine de jaune d'œuf (type 1, ≈ 99%, Sigma), trimargarine (C17, Sigma) le 4-hydroxy-2-hexénal deutéré (HHE d3) était synthétisés par Isabelle Jouanin (Plateforme Métatoul, Toulouse), le 4-hydroxy-2-nonénal deutéré (HNE d3) était acheté chez Cayman, les standards de HHE et HNE étaient achetés chez Interchim (France).

Les sels et solvants

Les sels et les solvants étaient tous de grade analytique : chlorure de potassium (99,5%, Merck), chlorure de sodium (100%, VWR Prolabo), bicarbonate de sodium (99,5%, Carlo Erba), chlorure de calcium (97%, Sigma), sodium dodecyl sulfate (SDS 99%, Janssen Chimica), hydroxyde de sodium (>97%, Carlo Erba), phosphate monobasique de sodium (98-100,5%, Sigma Aldrich), chloroforme (pour HPLC, Carlo Erba), méthanol (pour HPLC, ≥99,9%, Carlo Erba), ammoniaque (30%, Carlo Erba), éthanol (≥99,9%, Carlo Erba), acétonitrile (>99,9%, Biosolve BV), propan-2-ol (≥99,9%, Carlo Erba), hexane (>99,9%, Carlo Erba).

Les réactifs et antioxydants de synthèse

Les réactifs et les antioxydants utilisés étaient également de grade analytique : butylhydroxytoluène (BHT : 99%, SAFC), sels dissodiques d'éthylènediaminetétraacétique (EDTA : 99%, Panreac), acide trichloroacétique (≥99%, Sigma Aldrich), 1,1,3,3-tétraéthoxypropane (97%, Sigma), acide 2-thiobarbiturique (98%, Sigma), sulfate d'ammonium ferreux (>99%, Fluka), xylénol orange (sel tétrasodique, Fluka), peroxyde d'hydrogène (30%, Fluka), acide sulfurique (96%, Carlo Erba), alumine (N-super I, MP Biomedicals), chlorure d'hydrogène (37%, Carlo Erba), acide citrique anhydre (>99,9%, Fluka), O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl) hydroxylamine (PFBHA : >99%, Fluka), N,O-Bis(triméthylsilyl) trifluoroacétamide (BSTFA : >99%, Fluka), acide pipérazine-1,4-bis(éthane-2-sulfonique (PIPES : >99%, Sigma)..

III-2- MÉTHODES

III-2-1- Caractérisation des matières premières

III-2-1-1- Détermination de la composition et de la teneur en AG des lipides

La composition en acides gras des huiles a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) des esters méthyliques d'acides gras (Morrison and Smith, 1964).

Principe

Les acides gras de la fraction saponifiable (acides gras libres, estérifiés sur les glycérides, phosphoglycérides ou cholestérol) sont, après transméthylation en présence de solution méthanolique de trifluorure de bore, rendus volatils par dérivation sous forme d'esters méthyliques. Les esters méthyliques formés sont séparés et quantifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (FID). Les acides gras sont identifiés par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux d'un mélange « standard » (Menhaden oil; Supelco), constitué d'esters méthyliques d'acides gras dont l'identification a été faite par spectrométrie de masse.

Protocole

Méthylation des acides gras : environ 1 mg d'huile ou d'extrait lipidique sont introduits dans des tubes à vis de 10 mL munis d'un bouchon avec joint de téflon contenant au préalable 100 µL d'acide heptadecanoïque (C17:0 ; concentration environ 1 mg mL^{-1}) comme étalon interne. Le solvant est évaporé sous courant d'azote et les lipides ressolubilisés dans 1 mL de toluène (sauf dans le cas de l'analyse des phospholipides). Un millilitre de

solution méthanolique de trifluorure de bore (BF_3/CH_3OH ; 14 %) sont ensuite ajoutés. Les tubes fermés hermétiquement sont vortexés, et placés dans des blocs chauffants à 100°C pendant 45 min (10 min dans le cas des phospholipides). Après refroidissement des tubes, 0,5 mL d'eau purifiée millipore et 1 mL de cyclohexane y sont introduits. Après agitation du mélange et centrifugation (1000g ; 5 min ; 10°C), la phase organique supérieure contenant les esters méthyliques d'acides gras en solution dans le cyclohexane est prélevée et introduite dans des piluliers pour être injectée en CPG-FID pour analyse. L'identification est effectuée à l'aide d'un profil obtenu par analyse en CPG-FID, dans les mêmes conditions que pour les échantillons, d'un mélange de standard d'AG méthylés.

Chromatographie en phase gazeuse-FID : les analyses sont réalisées sur un chromatographe PerkinElmer Clarus 680 (N° série 680S10091403 ; Shelton, USA) couplé à un détecteur à ionisation de flamme, relié à un ordinateur pour la programmation et le pilotage du chromatographe et de l'injecteur automatique, l'acquisition des données et le traitement des chromatogrammes. Les échantillons (1 µL) sont injectés automatiquement en mode splitless et séparés sur une colonne capillaire [DB 225 30 m × 0,32 mm; 0,25 µm ; J&W Scientific]. Le gaz vecteur est l'hydrogène et son débit est maintenu constant à 2 mL min^{-1}. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont maintenues à 250°C. Les débits d'air et d'hydrogène alimentant la flamme sont respectivement de 400 et 40 mL min^{-1}. La programmation de la température du four est la suivante : 1 min à 50°C, montée à 180°C à 10°C min^{-1}, suivi d'une montée à 220°C à 5°C min^{-1} et enfin maintien de la température à 220°C pendant 10 min.

Les profils chromatographiques sont traités à l'aide du logiciel *TotalChrom*. La quantification des esters est réalisée par comparaison des aires sous les pics des différents acides gras identifiés, à celui des pics de l'étalon interne (acide heptadécanoïque). Les résultats sont exprimés soit en pourcentage massique de chaque acide gras détecté par rapport à la somme des acides gras détectés, soit en quantité (mg) calculée à partir de l'étalon interne et rapportée à la quantité de lipides méthylés.

III-2-1-2- Dosage des tocophérols

Le dosage des tocophérols a été déterminé par chromatographie liquide à haute pression soit directement à partir des huiles ou des mélanges lipidiques solubilisés dans du n-hexane, soit à partir des extraits lipidiques également resolubilisés dans du n-hexane. La détection est effectuée par fluorimétrie (Buttriss and Diplock, 1984).

Principe

Les tocophérols et les tocotriénols sont fluorescents. Les différents isomères des tocophérols (α, β, γ et δ) et des tocotriénols (γ dans notre cas) sont séparés et quantifiés directement à partir de solutions hexaniques d'huile sans saponification. La concentration en tocophérols, exprimée en µg g^{-1} d'huile (ppm), est déterminée grâce à un étalonnage externe réalisé en traçant, après séparation des différents isomères par HPLC et excitation, l'aire sous leur pic d'émission en fonction des concentrations croissantes d'isomères standards.

Protocole

Les huiles sont préparées dans du n-hexane à des concentrations variables, en fonction de leur niveau d'oxydation, comprises entre 10 et 100 mg d'huile par mL de n-hexane. Après solubilisation, 20 µL de ces solutions sont injectés automatiquement (Autosampler Ultimate 3000) dans un système HPLC (Dionex RS-LC Ultimate 3000) équipé d'une colonne de silice Dionex Polar advantage 2 (250 × 3 mm, 3 µm) couplée à un détecteur spectrofluorimétrique (Dionex RF-2000). La phase mobile, constituée d'un mélange n-hexane/éther ter-butylméthylique (90 : 10) est filtrée sous vide sur filtre 0,22 µm. Le débit de la phase mobile, en mode isocratique, est fixé à un débit de 0,5 mL min^{-1}. Lors de la séparation, la colonne est maintenue à une température de 30 °C et les échantillons à 10 °C. La détection fluorimétrique est réalisée par une excitation à 295 nm et une émission à 330 nm. Deux solutions standards contenant soit les isomères de tocophérols et une solution standard de γ-tocotriénol ont été utilisées pour établir les courbes étalons.

III-2-1-3- Purification des huiles

Les huiles alimentaires contiennent des antioxydants, majoritairement les tocophérols, qui les protègent de l'oxydation dans les conditions de conservation. Dans certaines conditions, il est indispensable de s'affranchir de leur présence. La méthode utilisée ici est celle décrite par (Berton *et al.*, 2011).

Principe

Lorsqu'elle est mise en contact avec les huiles, l'alumine adsorbe les lipides polaires (AGL, MAG et DAG) et les antioxydants polaires alors que les lipides apolaires ne le sont pas. Les constituants les plus polaires des huiles, adsorbés sur l'alumine sont séparés des huiles après centrifugation.

Protocole

Brièvement, environ 15 mL d'alumine (MP Alumina N-Super I, MP Biomedicals, France) et 30 mL d'huiles sont mélangés dans un tube à centrifuger de 50 mL en polypropylène. Après dispersion de l'alumine dans le mélange, celui-ci est mis à agiter à l'obscurité et à 4°C pendant une nuit avant d'être centrifugé (2000 g ; 10 °C ; 20 min). L'huile purifiée est récupérée, centrifugée de nouveau dans les mêmes conditions pour éliminer les traces d'alumine puis conditionnée dans des flacons en verres ambrés. Elle est ensuite désoxygenée par bullage d'azote pendant environ 10 minutes et les flacons, scellés sous azote, sont conservés à – 20°C.

III-2-2- Préparation et caractérisation des émulsions

Le choix des huiles utilisées dans cette étude pour la préparation des émulsions a été conditionné par le critère de leur utilisation courante en alimentation ainsi que la volonté d'évaluer l'effet de la nature des AGPI, longueur de chaîne et insaturation, sur l'oxydation des lipides. Ainsi, des huiles végétales, contenant les AGPI à courtes chaînes (LA, ALA) mais pas les AGPI à longues chaînes (EPA, DHA, AA, …), ainsi qu'une huile de poisson ont été utilisées. Les huiles végétales choisies étaient l'huile de colza riche en AGPI n-3 à courte chaîne (essentiellement ALA). L'huile de thon quant à elle contenait majoritairement les AGPI LC essentiellement constitués d'EPA, de DHA et d'AA). L'huile de tournesol oléique ne contenant pas d'AGPI a été utilisée pour équilibrer les compositions et teneurs en acides gras des différentes formulations.

III-2-2-1- Description des émulsions

Les systèmes alimentaires modèles utilisés pour les expérimentations sont des émulsions huile-dans-eau stabilisées d'une part par la SAB et d'autre part par des tensioactifs de grade alimentaire (lécithine de soja et Tween80). La phase aqueuse initiale utilisée pour la fabrication de l'émulsion est une solution de SAB ou de Tween80 préparée dans une solution saline de force ionique 143 mM (120 mM de NaCl, 6 mM de $CaCl_2$ et 5 mM de KCl). Les fractions massiques des émulsions utilisées pour les digestions *in vitro* sont de 10% (p/p) d'huile de colza (émulsion « colza-SAB ») ou de mélanges riches en AGPI n-3 LC (émulsion « n-3_LC-SAB ») stabilisées par la SAB (0,12% p/p). Une autre émulsion a été formulée qui était stabilisée par un mélange de tensioactifs constitué de Tween80 et PC (émulsion « n-3_LC-Tween80-PC »). Cette dernière contenait le Tween80 et la PC à des proportions de 0,1655 ± 0,0001 et 0,669 ± 0,003% $p/p_{émulsion}$ respectivement. L'expérimentation de gavage

des souris *in vivo* a été effectuée à partir d'une émulsion « n-3_LC-SAB » contenant 30% (p/p) de mélange d'huiles riche en AGPI n-3 LC et 0,35% p/p de SAB.

La formulation du mélange lipidique enrichi en AGPI n-3 LC a été adaptée de celle de Kabri et al. (en préparation pour soumission) établie conjointement à l'aide du logiciel NEMROD® (New Efficient Methodology for Research uning Optimal Design) et d'ajustement des proportions à partir de données expérimentales. Cette formulation a permis d'obtenir un mélange lipidique dont les AGPI n-3 étaient pour l'essentiel constitués d'AGPI LC (EPA et DHA) contrairement à l'huile de colza ne contenant comme AGPI que l'ALA. Pour l'émulsion « n-3_LC-SAB », le mélange est constitué, en masse, d'huiles de thon, de tournesol oléique et de tournesol dans les proportions 50 : 43,3 : 6,7. Pour l'émulsion « n-3_LC-Tween80-PC », l'huile de tournesol était remplacée par une masse équivalente de lécithine de soja (Lipoid P100) contenant essentiellement l'acide linoléique afin de maintenir une composition quantitative en AG proche de l'émulsion « n-3_LC-SAB ». La lécithine présente dans le mélange d'huile permet d'obtenir, après homogénéisation dans une solution de Tween 80, une émulsion de même composition que l'émulsion « n-3_LC-SAB », mais dont la nature de l'interface et le diamètre des gouttelettes lipidiques sont différents.

Les émulsions stabilisées par la SAB possèdent un pH de 6,43 ± 0,09, et présentent une distribution monomodale de gouttelettes lipidiques ayant un d_{43} de 1,74 ± 0,03 µm. Celles stabilisées par le mélange de tensioactifs ont un pH de 6,00 ± 0,09 et un diamètre hydrodynamique de 206 ± 4 nm (pdi = 0,157 ± 0,008).

III-2-2-2- Préparation des émulsions

Les émulsions utilisées pour les essais *in vitro* (10%, p/p) sont obtenues par dilution des émulsions mères à 30% (p/p) stabilisées par la SAB ou par le Tween80 et la PC dans la solution saline aqueuse. Les émulsions mères sont préparées à partir d'une solution de SAB (5 g L^{-1} ; pH 5,9) obtenue par dissolution dans 50 mL de solution saline de 250 mg de SAB ou d'une solution de Tween80 (7,1 g L^{-1}) obtenue en ajoutant 42g de solution saline à 300 mg de Tween 80. 35 g de ces solutions aqueuses et 15 g d'huile sont pesés dans un bécher de 100 mL. L'émulsification est réalisée en deux étapes : une pré-homogénéisation (15 000 tr min^{-1}, 3min) suivie d'une homogénéisation à 60 bars pendant 10 min pour les émulsions stabilisées par la SAB ou une pré-homogénéisation (12 000 tr min^{-1}, 5min) suivie d'une homogénéisation à 1500 bars pendant 10 min, la température étant maintenue à 10°C grâce à un cryostat (HAAKE). La pré-homogénéisation est effectuée par un rotor/stator Heidolph

(SilentCrusherM, no: 595- 06000-00-2, Schwabach, Germany), utilisant une tige de 12 mm de diamètre (Heidolph Typ 12 F/NM : 11-001-596-06-0). L'homogénéisation est effectuée par un homogénéisateur à valve basse pression (A0812W-A-CD, Stansted Fluid Power, UK) ou par un homogénéisateur haute pression (C3-Emulsiflex, Sodexim SA, France).

III-2-2-3- Teneur en protéines dans la phase aqueuse

La teneur en protéines des phases aqueuses des émulsions (30 % et 10 %) a été déterminée par la méthode de Markwell (Markwell *et al.*, 1978).

Principe :

Cette méthode est une modification de la méthode de Lowry impliquant une solubilisation des protéines des membranes ou des lipoprotéines par l'action d'un détergent, le SDS ajouté dans le réactif de dosage. Elle est basée sur la réduction du réactif phosphotungstomolybdique (réactif de Folin-Ciocalteu) par les protéines traitées par le cuivre (en particulier les résidus tyrosine et tryptophane). Cette réaction conduit à une coloration bleue dont l'absorbance est lue à 660 nm. La réponse obtenue est linéaire pour des concentrations en protéines comprises entre 10 et 100 µg mL^{-1}.

Protocole :

- Préparation de la gamme étalon : la quantification est réalisée grâce à un étalonnage externe. Une solution mère de SAB (1 mg mL^{-1}) a été utilisée pour établir la droite étalon par dilutions successives aux concentrations 10 ; 20 ; 40 ; 50 ; 60 ; 80 et 100 µg mL^{-1}. Les conditions de réaction entre les réactifs et les solutions de la gamme étalon de même que le blanc réactif (sans SAB) sont identiques à celles des extraits d'échantillons.
- Extraction et réaction colorée : 15 mL d'émulsion (30 % et 10 %) sont introduits dans un tube à centrifuger de 15 mL et centrifugés 45 min à 3500 g. La phase aqueuse (inférieure) est alors récupérée, filtrée successivement sur filtre 0,45 µm, 0,20 µm et 0,10 µm puis diluée (60, 25 et 12 fois pour la phase aqueuse de l'émulsion 10% et 175, 70 et 35 fois pour la phase aqueuse de l'émulsion 30%). Un mL des solutions étalons ou des dilutions sont introduits dans un tube à essai et 3 mL de réactif C [mélange de 100 parts de réactif A (2% de Na_2CO_3 + 0,4% de NaOH + 0,16% de tartrate de potassium-sodium + 1% de SDS) et d'une part de réactif B ($CuSO_4.5H_2O$ 4%)] y sont ajoutés. Après 20 min d'incubation à température ambiante, 0,3 mL de réactif de Folin dilué 1:1 (v/v) dans de l'eau millipore sont ajoutés, puis le tube est agité vigoureusement au vortex et incubé 45 min à température ambiante. L'absorbance à 660 nm est lue contre l'eau millipore, à l'aide d'un

spectrophotomètre UV (Shimadzu UV-1800) exactement après 45 min d'incubation, car la coloration n'est pas stable au cours du temps.

- Expression des résultats : les résultats sont exprimés en µg de protéines par mL d'échantillon après intrapolation de la droite étalon tout en tenant compte des facteurs de dilution utilisés.

III-2-3- Protocoles de digestion *in vitro*

II-2-3-1- Protocole *in vitro* pour le suivi de la lipolyse et de l'évolution des structures

Le protocole digestif utilisé mime les conditions gastriques et intestinales prandiales, étapes reconnues essentielles pour la digestion des lipides. La composition des sécrétions digestives, les concentrations en enzymes ou en extraits de ces sécrétions ou des milieux digestifs sont adaptées de celles décrites dans la littérature (Garrett *et al.*, 1999 ; Thakkar *et al.*, 2007). Les facteurs de dilution des émulsions par les sucs digestifs sont ceux utilisés par (Herrero-Barbudo *et al.*, 2009) pour des émulsions, initialement issus de (Oomen *et al.*, 2003). La teneur en mucine quant à elle a été tirée de données obtenues *in vivo* chez l'Homme lors de la détermination de l'effet d'un inhibiteur de la pompe à proton (rabeprazole) sur la teneur en mucine du suc gastrique après stimulation d'un état prandial naturel par la pentagastrine (Skoczylas *et al.*, 2003).

Les conditions digestives retenues pour le modèle mis en place dans le cadre de cette thèse sont présentées dans le tableau V.

Tableau V : Compartiments et conditions digestives retenus pour la conception du modèle digestif gastro-intestinal

Compartiment	Composition des sucs digestifs		Concentrations	Facteurs de dilution	pH initial
Gastrique (force ionique ≈ 133 mM)	Mucine de porc type 2		0,96 g L^{-1} dans le milieu gastrique	1,56	2,5 ou 4
	Pepsine		2,4 g L^{-1} dans le milieu gastrique		
	Solution saline	KCl	5 mM		
		$CaCl_2$	6 mM		
		NaCl	120 mM		
Intestinal (force ionique ≈ 137 mM)	Solution saline	KCl	5 mM	2,98	6,5
		$CaCl_2$	6 mM		
		NaCl	120 mM		
	Pancréatine de porc		0,4 g L^{-1} dans le milieu intestinal		
	Lipase pancréatique de porc		0,2 g L^{-1} dans le milieu intestinal		
	Extrait biliaire de porc		2,4 g L^{-1} dans le milieu intestinal		

Les sucs digestifs (gastrique et pancréatico-biliaires) sont préparés le jour même et agités 1 heure, dont au moins 15 min à 37°C directement avant utilisation. Le suc gastrique simulé est constitué de mucine (2,67 g L^{-1}) et de pepsine (6,67 g L^{-1}) solubilisées dans la solution saline. Le suc pancréatique simulé est une solution constituée de pancréatine (1,12 g L^{-1}) et de lipase pancréatique (0,56 g L^{-1}) dans de la solution saline. La bile reconstituée est une solution d'extrait biliaire (18,63 g L^{-1}) dans de la solution saline.

Le protocole digestif utilisé est schématisé par la figure 13. Quinze mL d'émulsion d'huile de colza 10% stabilisée par la SAB sont introduits dans un flacon en polypropylène (FP60VP ; 70 x 35) de 60 mL contenant un barreau aimanté. 8,44 mL de suc gastrique simulé y sont ensuite ajoutés et le pH du milieu est ajusté sous agitation à pH 2,5 ou 4 à l'aide de solutions de HCl (1 M et 0,1 M). Après une heure d'incubation à l'obscurité sous agitation (≈ 400 tr min^{-1}) dans une étuve (Biobloc scientific VCN 100, Votsch industrietechnik) thermostatée à 37°C (HR = 52%), le pH du milieu est ajusté à 6 (dénaturation irréversible de la pepsine) à l'aide de solutions de $NaHCO_3$ (0,9 M et 0,1 M). A ce milieu sont ajoutés successivement 5,09 mL de solution biliaire reconstituée et 14,63 mL de suc pancréatique

avant ajustement du pH du mélange à 6,5. Le milieu intestinal ainsi obtenu est incubé sous agitation à 37°C pendant 20 heures.

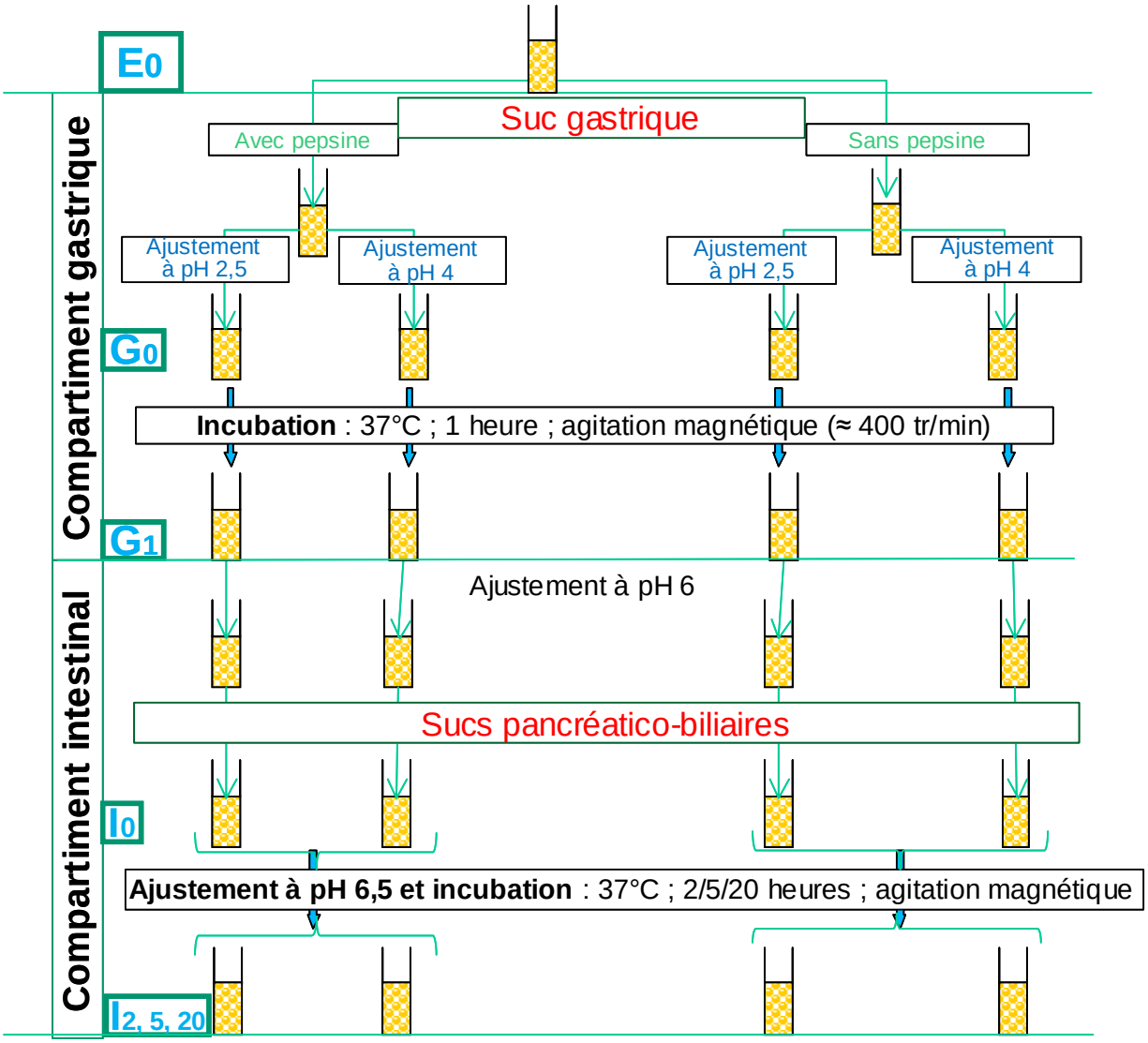


Figure 13 : Représentation schématique du protocole digestif gastro-intestinal utilisé

Aux différentes étapes du processus digestif, des aliquotes de l'émulsion et des milieux digestifs sont prélevées (tableau VI) et la taille et l'organisation des gouttelettes lipidiques présentes mesurées. Ensuite, après extraction des lipides de ces milieux, la lipolyse a été déterminée par chromatographie liquide haute performance (*HPLC*). Pour chacun des 4 protocoles digestifs, les échantillons prélevés sont les suivants : E0 (émulsion fraîche), G0 (émulsion + suc gastrique avant incubation), G1 (émulsion + suc gastrique après 1 heure d'incubation), I0 (G1 + suc pancréatico-biliaire avant incubation), I2 (I0 après 2 heures d'incubation), I5 (I0 après 5 heures d'incubation), I20 (I0 après 20 heures d'incubation). Ces échantillons sont ensuite analysés par :

- Diffusion statique de la lumière (SLS) après dilution ou non dans du SDS 1% pour déterminer la distribution en taille des particules et des gouttelettes lipidiques ;
- Microscopie optique afin de confirmer les informations obtenues par la diffusion statique de la lumière et avoir une vue d'ensemble du milieu considéré ;
- Extraction des lipides du milieu, suivie d'une séparation par chromatographie liquide des différentes classes de lipides présentes dans les extraits afin de suivre et évaluer la lipolyse ;
- Isolement de la phase micellaire des échantillons intestinaux et détermination, par diffusion dynamique de la lumière (DLS), des structures de tailles inférieures à la taille minimale caractérisable par SLS (<100 nm) et formée pendant la digestion intestinale.

Tableau VI : Préparation des échantillons pour les analyses granulométriques et l'extraction des lipides

Milieux	Volume d'échantillon	Préparation de l'échantillon	Analyses effectuées
G0	0,25 mL	+ 1,25 mL de SDS 1%	Diffusion statique de la lumière : évolution des structures présentes dans les milieux digestifs Microscopie optique (échantillons dilués dans la solution saline)
	0,25 mL	/	
G1	0,25 mL	+ 1,25 mL de SDS 1%	
	0,5 mL	/	
I0	1 mL	+ 1 mL de SDS 1%	
	1 mL	/	
I2	1 mL	+ 1 mL de SDS 1%	
	1 mL	/	
I5	1 mL	+ 1 mL de SDS 1%	
	1 mL	/	
I20	1 mL	+ 1 mL de SDS 1%	
	1 mL	/	
I0	5 mL	Centrifugation 45 min à 5 000 g à 4°C	Diffusion dynamique de la lumière → tailles des structures présentes dans la phase micellaire
I2			
I5			
I20			
G0	0,5 mL	+ 2 gouttes de $NaHCO_3$ (1 M) pour les milieux gastriques + 2 gouttes de HCl (1 M) pour les milieux Intestinaux	Extraction des lipides par la méthode Bligh & Dyer (protocole en deux étapes)
G1			
I0	1 mL		
I2			
I5			
I20			
Somme	34,25 mL		

G0 et G1 : milieux gastriques avant incubation et après 1 heure d'incubation respectivement
I0, I2, I5 et I20 : milieux intestinaux avant incubation et après 2, 5 et 20 heures d'incubation respectivement

II-2-3-2- Protocole *in vitro* pour le suivi de l'oxydation des lipides

L'oxydation des lipides au cours de la digestion a été évaluée après adaptation des conditions digestives décrites ci-dessus de manière à contrôler les échanges gazeux entre l'intérieur du système (milieux digestifs + volumes d'air initial à leur surface) et l'air ambiant. Pour ce faire, 3,36 mL d'émulsion et 1,89 mL de suc gastrique simulé sont introduits dans des tubes headspace de 20,5 mL contenant un barreau magnétique. Le pH des milieux est ensuite ajusté à 2,5 par ajout d'un volume prédéterminé de HCl 1M (32,2 µL pour les émulsions stabilisées par la SAB et 16 µL pour les émulsions « n-3_LC-Tween80-PC »). En fonction des conditions testées, 200 µL d'une solution de metmyoglobine de muscle squelettique de cheval à 0,55 mM ont été ajoutés avant ajustement du pH, permettant d'avoir une concentration finale de metmyoglobine de 20 µM dans le milieu gastrique. Les tubes étaient ensuite scellés avec des bouchons en aluminium pourvus de joint en téflon et incubés à l'obscurité et à 37°C pendant 1 heure sous agitation magnétique (400 tr min^{-1}). Pour simuler l'étape intestinale, pour les émulsions stabilisées par la SAB, après incubation gastrique, le pH des milieux était ajusté à 6,5 par addition de 100 µL de $NaCO_3$ 1M, avant l'ajout séquentiel de 1,26 mL de bile reconstituée et 3,5 mL de suc pancréatique simulé dont les pH étaient préalablement ajustés à 6,5. Pour les émulsions stabilisées par le Tween80 et la PC, 58 µL de $NaCO_3$ 1M étaient ajoutés et le pH des sucs pancréatico-biliaires n'était pas ajusté avant leur addition. En effet, contrairement aux émulsions stabilisées par la protéine pour lesquelles la détermination du volume de $NaCO_3$ à ajouter était difficile et moins précise sans cet ajustement, cette détermination pour l'émulsion stabilisée par les tensioactifs était suffisamment facile et précise sans ajustement pour supprimer cette étape intermédiaire. Afin de préserver l'étanchéité du système, les ajouts étaient effectués à travers les joints en téflon à l'aide de seringues munies d'aiguilles fines. Les tubes étaient ensuite remis à 37°C dans les mêmes conditions que pour la phase gastrique. Tout au long de ce protocole, la consommation d'O_2 dans l'espace de tête a été évaluée grâce à des prélèvements d'air, puis les tubes ont été utilisés pour le dosage des autres marqueurs de l'oxydation des lipides. Pour ces derniers, les aliquotes d'émulsions initiales ou de milieux digestifs sont introduites dans des tubes contenant un volume de solution éthanolique (MDA et HAs) ou isopropanolique (hydroperoxydes) de BHT conduisant à une concentration finale en BHT de 1,3 mM.

Pour évaluer l'effet des constituants des sucs digestifs sur l'oxydation lipidique, des tubes « contrôle » ont été préparés en remplaçant les sucs gastriques et pancréatico-biliaires

par un volume équivalent de solution saline, l'ajustement des pH étant effectué par des volumes de HCl et de $NaCO_3$ également prédéterminés.

Tout au long de ce protocole digestif, l'émulsion initiale (E0), l'émulsion + suc gastrique avant incubation (G0) et après 15 (G15), 30 (G30), 45 (G45) et 60 (G60) minutes d'incubation et les milieux intestinaux (G1 + sucs pancréatico-biliaires) avant incubation (I0), et après 30 (I30), 60 (I60), 90 (I90) et 120 (120) minutes d'incubation ont été prélevés. L'oxydation des lipides a ensuite été évaluée dans ceux-ci par la quantification de l'évolution des substrats (oxygène et AG), la disparition des antioxydants endogènes (tocophérols) et la formation de produits primaires (hydroperoxydes) et secondaires (malonaldéhyde ou MDA et hydroxyalcénals ou HAs).

III-2-4- Détermination de la taille et de l'organisation des particules dans les différents milieux

III-2-4-1- Par diffusion statique de la lumière (*SLS*)

Principe

Cette technique permet de mesurer la taille des particules et ainsi de déterminer la distribution de taille des particules dans l'émulsion et dans les milieux digestifs. Elle est basée sur la diffraction d'un faisceau monochromatique de rayon laser frappant les particules en solution diluée. La méthode d'analyse par diffusion-diffraction laser repose sur la théorie de Mie qui tient compte non seulement de la diffraction, mais aussi de la réflexion et de la diffusion du faisceau laser. Elle est utilisée pour les particules sphériques lorsque leurs dimensions avoisinent la longueur d'onde incidente. L'intensité du rayonnement diffracté et l'angle de diffraction sont fonction de la taille des particules. Plus la particule est petite, plus l'angle de diffraction est grand. Le logiciel utilisé permet de calculer la distribution de taille de particules qui fournit le meilleur ajustement entre les mesures expérimentales et les valeurs fournies par le modèle. Ce modèle optique utilisé pour le calcul nécessite de fournir la valeur du rapport des indices de réfraction de l'huile utilisée et de l'eau et le rapport des absorbances à 658 nm, longueur d'onde du laser. La lentille, d'une focale de 45 mm, est placée en amont de la cellule et permet de couvrir une gamme de taille comprise entre quelques centaines de nm et plusieurs dizaines de µm.

Protocole

Les échantillons sont prélevés et séparés en deux aliquotes, l'une est analysée en l'état et l'autre après dilution dans une solution de SDS 1% afin de mettre en évidence les phénomènes de floculation et de coalescence. Les dilutions utilisées dans la préparation des échantillons sont présentées dans le tableau VI. Les échantillons sont introduits dans la cuve de mesure contenant de l'eau jusqu'à obtention d'un taux d'obscuration compris entre 5-15 %.

Conditions d'analyse : les mesures ont été réalisées à l'aide d'un granulomètre laser (Mastersizer S long banc; Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK). Les indices de réfraction utilisés sont de 1,475 (partie réelle) et 0,01 (partie imaginaire) pour les huiles et de 1,331 pour l'eau, la densité considérée pour l'huile étant de 0,92. La distribution de taille des gouttelettes d'huile est exprimée en volume (répartition des sphères équivalentes qui pour un volume occupé identique à celui de l'échantillon mesuré, conduit au même spectre de diffraction), en surface ou en nombre. A partir de cette distribution des diamètres moyens, $d_{4,3}$ et $d_{3,2}$, sont calculés. Le $d_{4,3}$ ou diamètre de Herdan est le diamètre moyen d'une sphère qui aurait le même volume que les particules :

$$d_{4,3}=\frac{\sum_i n_i d_i^4}{\sum_i n_i d_i^3} \qquad \text{(Eq. 7)}$$

avec i l'indice de la classe de population considérée, n_i son effectif et d_i le diamètre des particules de cette population.

Le $d_{3,2}$ ou diamètre de Sauter est le diamètre moyen d'une sphère qui aurait le même rapport surface/volume que la population entière :

$$d_{3,2}=\frac{\sum_i n_i d_i^3}{\sum_i n_i d_i^2} \qquad \text{(Eq. 8)}$$

Ce diamètre permet de calculer la surface spécifique (S) exprimée en $m^2\ g^{-1}$ de lipides émulsifiés selon la formule :

$$S=\frac{6}{d_{3,2}}\,. \qquad \text{(Eq. 9)}$$

III-2-4-2- Par diffusion dynamique de la lumière (*DLS*)

Afin de caractériser les particules possédant des dimensions inférieures à la limite de mesure de la SLS et générées au cours des processus digestifs, en particulier dans les phases micellaires obtenues à partir des émulsions d'huile de colza, la technique de diffusion dynamique de la lumière a été utilisée. Cette technique a également servi à suivre les évolutions de structures des particules présentes dans les milieux digestifs et les phases micellaires obtenues à partir des émulsions « n-3_LC-Tween80-PC »

Principe

La technique de diffusion dynamique de la lumière est basée sur l'étude des fluctuations temporelles d'intensité lumineuse liées aux mouvements browniens des particules dans un échantillon liquide. La suspension diluée est placée dans une cuve de faible trajet optique, mais dont les dimensions perpendiculaires sont très grandes (considérées comme infinies). Elle est traversée par un faisceau continu de lumière cohérente. Les photons entrant dans le milieu subissent en moyenne une seule interaction avec les particules de la suspension. Une fonction d'autocorrélation est alors mesurée en fonction du temps. La fonction d'autocorrélation décroit exponentiellement avec un temps caractéristique. Ce temps de décroissance est relié directement au coefficient de diffusion Brownien des particules, à la viscosité du fluide dispersant qui doit être connue et au rayon moyen des particules. La technique permet la mesure d'une taille moyenne de quelques nanomètres à plusieurs micromètres et est réalisée sur un échantillon statique.

Protocole

Isolement de la fraction micellaire : les milieux intestinaux (I0, I2, I5 et I20) sont prélevés et centrifugés (5000g ; 45 min à 4°C) puis, la fraction aqueuse récupérée et filtrée sur filtre 0,20 µm.

Conditions d'analyse : les mesures ont été réalisées à l'aide d'un nanosizer (Nanosizer-S ZS, MAL500385). Les indices de réfraction utilisés sont de 1,450 pour les particules dispersées et 1,33 pour le milieu dispersant (eau) dont la viscosité utilisée par défaut était de 0,6864. Les échantillons sont introduits dans une cuve DTS0012 (12,5 x 12,5 x 45 mm) qui est insérée dans l'appareil. Après un temps d'équilibre de 2 min à 37 °C, 4 mesures sont effectuées par échantillon en rétrodiffusion (173°), à raison d'un run par mesure. La distribution de taille des particules dispersées est exprimée en intensité. A partir des données collectées, l'appareil calcule le diamètre hydrodynamique de la population ainsi que l'indice de polydispersité qui rend compte de la qualité de la mesure.

III-2-4-3- Par microscopique optique

Afin d'obtenir des informations sur la forme des particules et de confirmer les informations obtenues à partir de la granulométrie, des observations en microscopie optique ont été effectuées. Cette technique permet d'obtenir des informations qualitatives essentielles à la compréhension générale des systèmes. Elle permet également, bien que n'ayant pas donné lieu à une analyse d'image, d'évaluer grossièrement la taille des gouttelettes en fonction de l'échelle d'observation, d'estimer visuellement leur polydispersité et d'identifier certaines instabilités comme la coalescence ou la floculation. Les observations microscopiques ont été effectuées avec un microscope optique (ZEISS AXIOSKOP 2) à une résolution de 1360 x 840 en utilisant les objectifs de grossissement X10 (ZEISS ; ACHROPLAN, 10 x / 0,25) ou X40 (ZEISS ; PLAN-NEOFLUAR, 40x / 0,75) et une camera. Une goutte d'émulsion ou de milieu digestif, dilué ou non dans de l'eau millipore est déposée sur une lame et recouverte par une lamelle avant observation.

III-2-5- Détermination de l'hydrolyse

III-2-5-1- Hydrolyse des protéines par électrophorèse

La protéolyse de la SAB présente dans les émulsions colza-SAB a été évaluée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE). Des aliquotes de 200 µL de l'émulsion après ajout du suc gastrique simulé ont été prélevées à différents temps d'incubation en phase gastrique, traitées avec 625 µL de tampon SDS (100 mM Tris-HCL pH 8, 4,0% SDS, 3% β-mercaptoethanol, 10% glycérol et des traces de bleu de bromophénol) et chauffées à 95–100 °C pendant 5 min. Les échantillons sont ensuite refroidis à température ambiante et chargés dans les puits du gel d'électrophorèse dénaturant préalablement préparé dans des cuves d'électrophorèse Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad). Le gel de concentration est constitué d'acrylamide (12%), de SDS (0,1%), de persulfate d'ammonium (APS) (0,1%) et de N,N,N',N'-Tétraméthyléthylènediamine (TEMED) dans du tampon Tris (0,33 M). Le gel de séparation est constitué d'acrylamide (3%), de SDS (0,1%), d'APS (0,08%) et du TEMED dans du tampon Tris (0,24 M). Après dépôt de l'échantillon, l'électrophorèse est effectuée à ampérage constant de 30 mA par gel. Ces derniers ont ensuite été colorés pendant une heure avec du bleu de Coomassie R-250 (0,2% ; p/v) dans une solution d'éthanol (30,0% ; v/v) et d'acide acétique (5,0% v/v). Après une nuit de décoloration dans un mélange éthanol-acide acétique (1:1 ; v/v), le gel a été scanné (image scanner III ; GE healthcare, USA).

III-2-5-2- Évaluation de la lipolyse

La lipolyse a été évaluée après analyse par chromatographie liquide couplée à un détecteur à diffusion de lumière (DDL) des extraits lipidiques des milieux digestifs, l'extraction étant effectuée par la méthode en deux étapes de Bligh & Dyer ou par la méthode d'extraction en une étape par le mélange hexane-isopropanol.

III-2-5-2-1- Extraction des lipides par la méthode de Bligh & Dyer (1959)

Principe

Cette méthode repose sur l'extraction et la séparation en deux étapes et à froid des lipides contenus dans les échantillons (Bligh and Dyer, 1959). La première étape est basée sur une extraction optimale des lipides contenus dans les échantillons quand ceux-ci sont homogénéisés avec un mélange chloroforme-méthanol qui, avec l'eau contenue dans l'échantillon forme un système monophasique dans des proportions 1:2:0,8 ($CHCl_3$:CH_3OH:H_2O, v/v/v). Dans ces conditions, le méthanol provoque la rupture des liaisons lipides-protéines et le chloroforme solubilise les lipides libérés. La deuxième étape quant à elle est basée sur la séparation, après ajustement des volumes des composants du mélange aux proportions 2:2:1,8 ($CHCl_3$:CH_3OH:H_2O, v/v/v), du système monophasique en deux phases. La phase supérieure eau-méthanol contient les composés non lipidiques et la phase inférieure chloroformique les lipides.

Protocole

Dans un tube à vis de 10 mL à bouchon avec joint téflon, les volumes d'échantillon, de NaCl (pour ajuster la proportion d'eau si nécessaire) et de solvants sont introduits comme indiqué dans le tableau ci-dessous (mélange 1).

	Volume prélevé (µL)	V_{NaCl} 150 mM (µL)	V_{CH3OH} (µL)	V_{CHCl3} (µL)
Milieu gastrique + 2 gouttes $NaHCO_3$ 1M	500	264	2000	1000
Milieu intestinal + 2 gouttes HCl 1M	1000	0	2586	1293
Émulsion 10%	1000	106	2500	1250

Après agitation au vortex (2500 tr min^{-1}) pendant 2 minutes on obtient un système monophasique. Les volumes de $CHCl_3$ puis de NaCl sont séquentiellement ajoutés aux mélanges 1 comme indiqués dans le tableau ci-dessous, avec des étapes intermédiaires d'agitation au vortex de 1 min.

	V_{NaCl} 150 mM (µL)	V_{CHCl3} (µL)
Milieu gastrique + 2 gouttes $NaHCO_3$ 1M	264	1000
Milieu intestinal + 2 gouttes HCl 1M	0	1293
Émulsion 10%	106	1250

Le mélange final est ensuite agité au vortex, puis centrifugé 5 min à 2000 g et à 10°C. On obtient 2 phases, une phase inférieure chloroformique et une phase supérieure méthanolique-aqueuse séparées par une fine pellicule à l'interface. La phase inférieure est prélevée à l'aide d'une pipette pasteur en verre, en faisant attention de ne pas prélever la phase supérieure et introduite dans un tube taré (m_1 en mg). Deux autres extractions (en une seule étape cette fois-ci) sont effectuées en ajoutant dans le tube le volume de $CHCl_3$ correspondant au volume de la phase chloroformique prélevée. Les phases chloroformiques poolées sont évaporées à sec, sous flux d'azote et jusqu'à masse constante (m_2 en mg). Les lipides extraits sont pesés et repris dans du $CHCl_3$ en utilisant des fioles jaugées, pour avoir la concentration exacte en extraits lipidiques. Ces extraits sont conservés à – 80°C dans des piluliers fermés hermétiquement.

La masse de lipides extraits en milligramme est donnée par la formule **:**

$\boxed{\mathbf{m}\ (\text{mg}) = m_2 - m_1}$

La concentration en lipides totaux (exprimée en mg mL^{-1}) des échantillons est obtenue grâce à la formule suivante :

$\boxed{\mathbf{[Lipides]_T} = (m / V)}$

Avec V : volume total après reprise dans le $CHCl_3$ (en mL).

Le rendement d'extraction est donné par la formule **:**

$\boxed{\mathbf{R} = (m / m_{attendue}) \times 100}$

Avec $m_{attendue}$ calculée de façon théorique à partir de la teneur initiale en lipides des émulsions digérées et en tenant compte des différentes dilutions effectuées.

III-2-5-2-2- Extraction des lipides par la méthode hexane-isopropanol (Hara and Radin, 1978)

Principe

Cette méthode repose sur l'extraction et la séparation à froid et en une étape des lipides contenus dans les échantillons par un mélange hexane-isopropanol 3:2 (v/v). Après agitation et centrifugation des échantillons et du mélange de solvant, le milieu se sépare en deux phases : une phase inférieure eau-isopropanol contenant les composés non lipidiques et la phase supérieure hexanique contenant les lipides.

Protocole

Dans un tube à vis de 10 mL à bouchon avec joint téflon, 0,5 à 1 mL d'échantillon sont introduits puis 0,2 mL de NaCl 150 mM (pour favoriser la séparation de phase) et enfin 6 mL d'hexane et 4 mL d'isopropanol. Après agitation au vortex (2500 tr min^{-1} pendant 2 minutes) et centrifugation (5 min ; 2000 g ; 10°C) il se forme un système biphasique formé d'une phase inférieure eau-isopropanol contenant les composés non lipidiques et une phase supérieure hexanique contenant les lipides séparées par une fine pellicule à l'interface.

La phase hexanique supérieure est prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur en verre et recueillie dans un tube taré (m_1 en mg). Deux autres extractions sont effectuées en ajoutant dans le tube un volume d'hexane correspondant au volume de la phase hexanique prélevée. Les phases hexaniques sont poolées et évaporées à sec, sous flux d'azote, jusqu'à masse constante (m_2 en mg). Les lipides extraits sont pesés et repris dans de l'hexane en utilisant des fioles jaugées, pour avoir la concentration exacte des extraits lipidiques. Ces extraits sont conservés à – 80°C dans des piluliers fermés hermétiquement.

La masse des lipides extraits, la concentration en lipides totaux des échantillons et les rendements d'extraction sont déterminés de la même manière que pour la méthode de Bligh & Dyer (1959).

III-2-5-2-3- Séparation, identification et quantification des produits de lipolyse

Séparation : 10 µL d'extrait lipidique dans le chloroforme (0,3 mg mL^{-1} d'extrait gastrique et intestinaux avant incubation, et 1,2 mg mL^{-1} d'extrait intestinaux après incubation) sont injectés automatiquement (Autosampler Ultimate 3000) sur un système HPLC (Dionex RS-LC Ultimate 3000) équipé d'une colonne couplée à un détecteur à diffusion de lumière. La phase mobile est constituée de deux solvants, le solvant A (chloroforme) et le solvant B (méthanol/ammoniaque/chloroforme : 460/35/5) filtrées sous vide sur filtre 0,22 µm avant utilisation. La séparation chromatographique a été réalisée à un débit de 1,5 mL min^{-1} suivant un gradient linéaire en trois étapes conformément au schéma suivant: 0% B (t 0 min) → 50% B (t 8min) → 100% B (t 12min) → 100% B (t 15min) → 0% B (t 15,1min) et enfin en condition isocratique (0% B) pendant 3 min. Le temps total d'analyse chromatographique est de 20 minutes par échantillon, correspondant à un temps d'analyse de 18 min et un temps de restauration des conditions initiales et de rééquilibrage de la chaîne HPLC de 2 min. La séparation est effectuée sur une colonne de silice (Prevail Silica : 150 × 4,6 mm, 3 µm), la température de la colonne et des échantillons étant maintenue à 30°C et 20°C respectivement.

La détection des classes lipidiques a été effectuée au moyen d'un détecteur à diffusion de lumière Sedex model 85 (S.E.D.E.R.E., Alfortville, France). La pression du gaz nébuliseur est maintenue à 6 bars, la température du tube de nébulisation est fixée à 50°C.

Identification et quantification : L'identification des classes lipidiques a été effectuée par comparaison des temps de rétention des pics obtenus après analyse des extraits lipidiques avec ceux de solutions standards. La quantification des lipides détectés a été réalisée grâce à un étalonnage externe. Deux solutions mères, une contenant les standards des classes de lipides neutres (trioléine, 1,2-dioléine, 1,3-dioléine, monooléine et acide oléique) et une autre contenant la 2-oléoyl-1-stéaroyl-sn-glycéro-3-phosphocholine et la L-α-lysophosphatidyl-choline de jaune d'œuf aux concentrations de 1 mg mL^{-1}, ont été préparées avec des quantités équivalentes de chacun des standards. Les gammes d'étalonnage ont été préparées par dilution des solutions mères. Les concentrations des points de gamme sont les suivantes : 0,0125 ; 0,025 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 et 0,4 µg μL^{-1}. L'analyse chromatographique (10 µL injectés) a permis d'établir, en utilisant un model quadratique d'ordre 2, la courbe étalon donnant la valeur de l'aire sous les pics d'espèces lipidiques en fonction de la quantité injectée en µg. Les résultats sont présentés en pourcentage du nombre de moles d'acides gras de chaque classe lipidique par rapport au nombre de moles d'acides gras présents dans toutes les classes lipidiques quantifiées. La lipolyse est calculée comme le pourcentage molaire d'acides gras libres par rapport au nombre de mole total d'acides gras présents dans les extraits lipidiques à un temps donné. La bioaccessibilité quant à elle est calculée comme le pourcentage molaire des AG absorbables (MAG et AGL) par rapport aux acides gras totaux présents dans les extraits lipidiques à un temps donné.

III-2-6- Suivi de l'oxydation des lipides au cours de la digestion

III-2-6-1- Détermination de la consommation d'oxygène

Principe

L'oxydation des lipides se caractérise en premier lieu par la fixation de l'oxygène sur les radicaux lipoyles formés lors de l'initiation. En système clos, la quantité d'O_2 présent dans le milieu diminue. La mesure de la consommation d'oxygène fournit une information directe et fiable sur le démarrage de la réaction d'oxydation. Cette consommation a été déterminée par analyse en chromatographie en phase gazeuse (CPG) de la phase gazeuse au-dessus des différents milieux. Les gaz de l'échantillon sont séparés sur une colonne à couche poreuse

(Molsieve 5Å, 10m x 0,32 mm ; 0,30 µm) puis détectés et quantifiés à l'aide d'un catharomètre.

Protocole

Analyse CPG/*TCD* (détecteur à conductivité thermique ou catharomètre) : Un échantillon de 100 µL d'espace de tête est injecté avec une seringue à gaz (eVol SGE Analytical Science) de 500 µL, dans l'injecteur en mode *split* (T= 50°C ; débit de fuite : 30 mL min^{-1}) d'un Chromatographe (Hewlett Packard P5890 Series II) relié à une colonne capillaire recouverte d'un polymère poreux (Molsieve 5A CP7535) et couplée à un détecteur à conductivité thermique. L'analyse est réalisée en mode isotherme à 50°C. L'hélium, à un débit de 2 mL min^{-1} est utilisé comme gaz vecteur. La température du détecteur est fixée à 125 °C. Le passage dans le catharomètre des molécules autres que celles du gaz vecteur se traduit par un changement de conductivité thermique du milieu et donc par le passage d'un courant et l'enregistrement d'une variation de la tension. Le pic correspondant à l'élution de l'oxygène (temps de rétention ≈ 0,8 min) a été identifié par comparaison du chromatogramme à celui obtenu par injection de 100 µL d'air prélevé dans l'espace de tête de tubes de référence préparés de manière similaire et contenant à la place des milieux digestifs un égal volume d'eau ultrapure.

Traitement des données et mode d'expression des résultats : la quantité d'O_2 initialement présent dans l'espace gazeux à l'intérieur des tubes a été calculée en tenant compte du volume d'air dans les tubes (V_{tubes} = 20,5 mL ; $V_{gastrique}$ = 5,3 mL ; $V_{intestinal}$ = 10,1 mL), de la concentration en O_2 de l'air à pression atmosphérique et du volume, occupé à température et pression normale, par une mole de gaz, ceci en assimilant l'air et l'O_2 à des gaz parfaits. La quantité d'oxygène restant dans les flacons à chaque temps a été déterminée en rapportant la surface du pic d'O_2 obtenue par intégration effectué à l'aide du logiciel *TotalChrom* après injection de 100 µL d'échantillon gazeux, à celle obtenue en injectant 100 µL d'air des tubes de reférence et en tenant compte du volume total de phase gazeuse. Les résultats ont ensuite été convertis en quantité d'O_2 consommée ($Q_{O2\text{-}C}$) en soustrayant la quantité d'O_2 restante dans le tube de la quantité d'O_2 initialement présente. Enfin, la quantité d'O_2 consommée a été rapportée à la quantité d'huile présente dans les tubes (1,47 g) et exprimée en µmole d'O_2 par gramme d'huile ($Q_{O2\text{-}C}$ g^{-1} d'huile). Cette quantité est la moyenne des valeurs obtenues pour trois ou quatre prélèvements gazeux par tube.

$$Q_{O2\text{-}C} = \frac{V_{\text{espace de tête (mL)}} \times V_{\text{O2 dans 100 µL d'air atmosphérique (L)}}}{V_{\text{injecté (mL)}} \times V_{\text{m (L mole}^{-1})}} \left(1 - \frac{S_{\text{pic O2 espace de tête}}}{S_{\text{pic O2 air atmosphérique}}} \right)$$

$$Q_{O2\text{-}C}\ g^{-1}{}_{\text{d'huile}} = \frac{Q_{O2\text{-}C\ (\mu mole)}}{m_{huile\ (g)}}$$

Avec : $V_{O2\ \text{dans 100 µL d'air atmosphérique}} = 20{,}946.10^{-6}$ L ; $V_m = 22{,}4$ L mole^{-1}; $V_{injecté} = 100$ µL = 0,1 mL et $V_{espace\ de\ tête_gastrique/intestinal} = V_{tube} - V_{gastrique/intestinal}$

III-2-6-2- Dosage des hydroperoxydes

Principe

En milieu acide, les hydroperoxydes (HPX), qui sont des produits primaires de l'oxydation des lipides, oxydent le Fe^{2+} présent dans le réactif FOX 2 en Fe^{3+} qui forme avec le xylénol orange un complexe de couleur bleue absorbant la lumière dans le visible avec un maximum d'absorption à 560 nm. A cette longueur d'onde, l'absorbance de la solution, déterminée par spectrophotométrie, est proportionnelle à la quantité totale d'HPX présents dans le milieu qui peut être déterminée par étalonnage externe au moyen d'une gamme étalon établie à l'aide de quantités connues de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Protocole

Des aliquotes d'échantillons d'émulsions ou de milieux digestifs (300 ou 360 µL) sont, en fonction de leur teneur en HPX dilués 330 à 1300 fois dans l'isopropanol. Parallèlement, une gamme étalon, établie pour des concentrations en H_2O_2 de 0 ; 0,56 ; 1,13 ; 2,26 ; 3,39 ; 4,51 ; 5,64 ; 6,77 ; 7,90 ; 9,03 et 11,29 µmol L^{-1}, est préparée par dilution dans de l'isopropanol d'une solution mère de peroxyde d'hydrogène (170,1 µM). Des volumes de 150 µL des échantillons dilués et des solutions étalons sont ensuite mis à réagir avec 1350 µL de réactif FOX 2 [solution méthanolique de BHT (2 mM), xylénol orange (50 µM), H_2SO_4 (13 µM) et de $FeH_8N_20_2S_2.6H_20$ (125 µM)] à l'obscurité pendant 30 min exactement.

Les milieux réactionnels sont ensuite filtrés sur membrane de cellulose régénérée (Chromafill Xtra RC-45125, ϕ 0,45 µm) et introduits dans des cuves en quartz à trajet réduit (Hellma 108.002 QS 10 mm). L'absorbance est lue à 560 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (Shimadzu UV-1800) avec une cuve de référence contenant de l'isopropanol. La détermination de la concentration en hydroperoxydes est effectuée à l'aide de la pente et de l'ordonnée à l'origine de la droite étalon au moyen de la formule suivante :

$$[HPX] = \frac{\left(\frac{DO - b}{a}\right)}{[huile]}$$

Avec : [HPX], la concentration en hydroperoxydes de l'échantillon exprimée en équivalent molaire d'H_2O_2 par g d'huile ; DO, la densité optique mesurée ; « a » et « b »

respectivement la pente et l'ordonnée à l'origine de la droite étalon ; et [huile], la concentration en huile du milieu réactionnel.

III-2-6-3- Dosage du malondialdéhyde (MDA)

La méthode à l'acide thiobarbiturique (TBA) est la méthode la plus couramment utilisée pour le dosage du malondialdéhyde. La méthode utilisée pour notre étude est une adaptation des méthodes de la littérature (Botsoglou *et al.*, 1994 ; Grau *et al.*, 2000 ; Seljeskog *et al.*, 2006 ; Mendes *et al.*, 2009). L'optimisation de cette méthode de quantification du MDA a été effectuée lors de mon stage de Master II au sein du laboratoire.

Principe

Le TBA réagit avec le MDA pour former un complexe de couleur rose possédant des propriétés fluorimétriques. La concentration en MDA, exprimée en nmole de MDA par g d'huile, est évaluée par mesure, après séparation du complexe MDA-$(TBA)_2$ par HPLC et excitation à une longueur d'onde précise, de l'intensité de la lumière émise. Cette mesure étant effectuée sur des solutions de MDA extraites des échantillons par une solution d'acide trichloroacétique (TCA).

Protocole

Préparation de la gamme étalon : la quantification est réalisée grâce à un étalonnage externe. Une solution mère de MDA a été préparée par hydrolyse acide, d'une solution de TEP à 1 mg mL^{-1} dans du HCl 0,1 N, au bain-marie bouillant. La concentration de cette solution de MDA a été déterminée par mesure spectrophotométrique de l'absorbance à 245 nm avec pour coefficient d'extinction molaire 13 500 (Esterbauer *et al.*, 1991). Cette solution mère de MDA a été utilisée pour réaliser la courbe étalon par dilutions successives aux concentrations 0,0125 ; 0,025 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 3,5, 5 et 7,5 µM. Les conditions de réaction entre le réactif TBA 55,5 mM et les solutions de la gamme étalon de même que le blanc réactif (constitué de TCA) sont identiques à celles des extraits d'échantillons.

Extraction à partir des matières premières : des volumes précis d'échantillons (les prélèvements contenant 100 à 200 µL d'émulsions ou de milieux digestifs en fonction des niveaux d'oxydation, 200 µL de plasma ou 300 µL des préparations des prélèvements des milieux digestifs des souris avant ou après gavage), 40 µL de solution de butyl hydroxytoluène (BHT : 1 mg mL^{-1}) dans l'éthanol (pour les plasmas), 80 µL de solution d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) 0,1 M et 5 à 10 mL de TCA (5% p/v ou 0,3 M) sont successivement ajoutés dans un tube à vis de 10 mL muni d'un bouchon à joint

téflon. L'ensemble est agité au vortex pendant 1 min et les tubes sont ensuite introduits dans un bain de glace et mis au bain à ultrason pendant 5 min. Après centrifugation, il se forme une phase inférieure aqueuse trouble sous une fine pellicule lipidique. Dans le cas des plasmas, après passage au bain à ultrason, les échantillons sont centrifugés (500 g ; 5 min ; 10°C), ceci conduisant à la séparation du mélange d'extraction en un surnageant limpide et un culot laiteux. En fonction de la nature des échantillons, trois millilitres des phases troubles ou limpides sont introduits dans un tube à essai et 3 mL de réactif TBA (55,5 mM) y sont ajoutés. Les tubes fermés par un bouchon à joint téflon sont homogénéisés au vortex pendant 5 secondes et incubés précisément 20 min au bain-marie à 70°C. A la sortie du bain-marie, les tubes sont placés dans un bain d'eau froide pour refroidissement et les solutions introduites dans des piluliers pour l'analyse HPLC-Fluorimétrie.

Conditions d'analyse HPLC-Fluorimétrie : la séparation s'est faite à l'aide d'une chaîne HPLC (Dionex RS-LC Ultimate 3000) équipée d'une colonne Symmetry C18 (150 m × 4,6 mm, 5 µm) couplée à un détecteur fluorimétrique (Dionex RF-2000). La phase mobile, constituée d'un mélange tampon NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 (50 mM, pH 6,8)-méthanol-acétonitrile (72:17:11, v/v/v), est filtrée sous vide sur filtre 0,22 µm, l'élution, en mode isocratique se faisait à un débit de 1 mL min^{-1}. La température de la colonne et des échantillons est maintenue à 20°C pendant la séparation. L'acquisition fluorimétrique, d'une durée de 8 minutes, est caractérisée par une longueur d'onde d'excitation de 535 nm et par une longue d'onde d'émission à 555 nm. Les longueurs d'ondes d'excitation optimale et d'émission maximale ont été déterminées sur des solutions standards après réaction avec le réactif de TBA à l'aide d'un spectrofluorimètre (HITACHI F-4500).

Traitement des données et mode d'expression des résultats : le pic correspondant au complexe MDA-$(TBA)_2$ est sélectivement détecté, et son aire obtenue par intégration grâce au logiciel « Chroméléon ». La relation de proportionnalité entre la concentration en MDA des solutions injectées ([MDA], µM), et la valeur de l'aire des pics ($S_{MDA\text{-}(TBA)_2}$, mV*min) correspondant au volume de solution injectée est la suivante : $S_{MDA\text{-}(TBA)_2}$ = **a** × [MDA]. Le nombre de µmole de MDA dans l'échantillon est donnée par la relation $n_{MDA\text{-}(TBA)_2}$ = [MDA] $\times V_{extraction}$ avec $V_{extraction} = V_{échantillon} + V_{BHT/EtOH} + V_{EDTA} + V_{TCA}$. Les quantités en µmole de MDA par gramme d'huile sont données par la relation :

$$Q_{MDA} = \frac{n_{MDA-(TBA)_2}}{m_{prised'essai}} \times 1000$$

Avec : [MDA] en µM ; $V_{extraction}$, $V_{échantillon}$, $V_{BHT/EtOH}$, V_{EDTA} et V_{TCA} en L ; $m_{prise\ d'essai}$ en mg ; **a** = pente de la droite étalon

III-2-6-4- Dosage du 4-hydroxy-2-nonénal et du 4-hydroxy-2-hexénal

Principe

Les hydroxyalcénals (HAs) libres possèdent deux fonctions chimiques permettant une double dérivation pour rendre ces dérivés volatils. Les fonctions aldéhyde et alcool sont respectivement dérivatisées par le pentafluorobenzyl hydroxylamine et le bis(triméthylsilyl) trifluoroacétamide. Les dérivés pentafluorobenzyl-triméthylsilyl (O-PFB-TMS) produits présentent des propriétés qui permettent leur séparation, identification et quantification par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Protocole

Dérivation des hydroxyalcénals : La méthode utilisée est une adaptation de celle proposée par (Michalski *et al.*, 2008).

100 à 400 µL d'échantillon, complété à 500 µL avec du tampon PIPES (0,1 M ; pH 6,5), sont introduits dans un tube à essai contenant 1 mL de réactif PFBHA [50 mM dans du tampon PIPES (acide pipérazine-1,4-bis(éthane-2-sulfonique) ; 0,1 M ; pH 6,5] et 15 ng d'étalon deutéré du 4-hydroxy-2-nonénal et du 4-hydroxy-2-hexénal dans l'éthanol. Après ajout de 50 µL d'acide citrique, les tubes sont fermés sous azote et laissés à réagir sous une agitation légère (500 tr min^{-1}) pendant 30 min à température ambiante. Aux milieux contenant, après réaction, les dérivés O-PFB, sont successivement ajoutés 2,5 mL de méthanol, 5 mL d'hexane et 60 µL de H_2SO_4 98 % avec une agitation intermédiaire d'une minute à 2500 tr min^{-1}. Après 5 min de centrifugation (1000 g ; 5 min ; 10°C), 4 mL de phase hexanique supérieure sont transférés dans un tube à essai, concentrés par évaporation sous azote et récupérés dans des tubes coniques à volumes réduits. L'hexane est ensuite totalement évaporé sous azote et 100 µL de BSTFA sont ajoutés aux tubes qui sont, après agitation, mis à réagir 30 min à 60°C.

L'analyse a été faite à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse (Thermo Trace GC Ultra) équipé d'une colonne DB5-MS (30 m x 0,32 mm ; 0,25 µm) couplée à un spectromètre de masse quadripolaire (DSQII MS 220-52-43). La colonne était maintenue initialement à 57°C. Le programme de température utilisé est le suivant : 2 min à 57°C, montée à 180°C à 20 °C min^{-1} suivi d'une montée à 280°C à 4 °C min^{-1}. Après refroidissement, les échantillons étaient automatiquement injectés en mode splitless, l'interface, l'injecteur et la source d'ion étant maintenus aux températures 280, 260 et 130°C respectivement. L'énergie des électrons était fixée à 70 eV, les gaz vecteur et réactant étant respectivement l'hélium et le méthane. Le spectre de masse était acquis en courant ionique

total (*TIC*) entre 50 et 800 m z^{-1} en mode ionisation chimique négative, le voltage du photomultiplicateur étant fixé à 1379 V. L'analyse et l'extraction des chromatogrammes ainsi que l'identification des pics ont été effectuées grâce au logiciel Xcalibur au moyen de 4 ions caractéristiques des différents isomères : 241-271-291-361 pour le 4-HHE ; 244-274-294-364 pour le 4-HHE deutéré ; 283-313-333-403 pour le 4-HNE et 286-316-336-406 pour le 4-HNE deutéré. La quantification, quant à elle, a été réalisée par étalonnage interne après avoir déterminé, au moyen de solutions standard, la relation linéaire existante entre le rapport (aire HAs)/(aire $HAs_{deutéré}$) et leurs quantités dérivées suivant la formule :

$$m_{HAs} = \frac{\left(\frac{Aire_{HAs}}{Aire_{HAs\ deutéré}} - b \right)}{a}$$

Avec : m_{HAs} la masse en ng d'HAs dans le volume d'échantillon ; $Aire_{HAs}$ l'aire sous le pic des HAs ; $Aire_{HAs\ deutéré}$ l'aire sous le pic des HAs deutérés et « a » et « b », la pente et l'ordonnée à l'origine de la droite étalon respectivement.

III-2-7- Études *in vivo* après gavage chez la souris

Pour tenter de faire le lien entre les résultats obtenus sur l'oxydation des lipides lors de la digestion *in vitro* et ceux obtenus par Awada *et al* (2012) dans le cadre de sa thèse (programme ANR AGEcaninox) sur les effets d'une alimentation sur le long terme de souris avec des régimes contenant plus ou moins de lipides oxydés ou sur les effets du gavage direct des souris avec des quantités connues de 4-HHE, des essais *in vivo* ont été effectués. Ils avaient pour but d'évaluer l'effet, en présence ou non de metmyoglobine, de la consommation d'une émulsion stabilisée par la SAB et riche en AGPI n-3 LC (cf titre III-2-2-1-), sur les concentrations dans les milieux digestifs et dans le plasma de certains marqueurs de leur oxydation : le MDA, le 4-HHE et le 4-HNE.

Les animaux

Les expériences ont été réalisées sur des souris mâles CDI SWISS de 5 mois ayant un poids moyen de 47 ± 5 g (Janvier, Le Genest St Isle, France). Les animaux, soumis à un cycle de 12 heures de lumière suivies de 12 heures d'obscurité, ont été hébergés dans une pièce convenablement aérée et thermostatée (24 ± 1 °C), et ayant une humidité relative de 50 ± 20 %. Ils avaient libre accès à la nourriture (Aliment A03, SAFE, France) et à l'eau.

L'expérimentation animale

Les études sur les souris ont été réalisées au sein de l'UMR Carmen de Lyon.

Tous les protocoles expérimentaux ont été conduits en accord avec la directive européenne du 24 novembre 1986 (86/609/EEC) et le décret du 19 avril 1988. Les expérimentateurs étaient qualifiés et détenteurs d'un certificat spécial (n° 69266257) d'expérimentation sur des animaux vertébrés vivants émis par le Ministère de l'Agriculture et du Département des services vétérinaires (annexes 3 et 4).

Les souris, préalablement mises à jeûn pendant la nuit, ont été réparties en deux groupes de 18 souris : le groupe essai « émulsion » qui a reçu une simple administration orale de 500 µL d'émulsion 30 % et le groupe essai « émulsion + metmyoglobine » gavé avec 500 µL d'émulsion 30 % contenant de la metmyoglobine (20 µM). Les souris ont ensuite été anesthésiées (5 min avant sacrifice) par injection intra-péritonéale de pentobarbital sodique (35 mg kg^{-1}) et sacrifiées une, deux et quatre heures après gavage. Parallèlement, un groupe contrôle constitué de 6 souris à jeûn a également été sacrifié au temps « zéro » sans avoir reçu d'émulsion. Le sang des souris a été prélevé par ponction intracardiaque (environ 1,5 mL) et centrifugé (1 minute, 9400 rpm). Le plasma est ensuite collecté, immédiatement congelé dans l'azote liquide et stocké à -80°C. Les contenus gastriques et intestinaux, le duodénum et le jéjunum de l'intestin grêle ont aussi été collectés, immédiatement congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C. Quelques millilitres d'émulsion de gavage ont également été conservés à -80°C.

Traitement des prélèvements des milieux digestifs des souris

Après décongélation et pesée des prélèvements gastriques et intestinaux, il a été constaté qu'ils contenaient de la litière probablement ingérée par les souris pendant leur mise à jeûn. De ce fait, les quantités des contenus digestifs pesés ne correspondaient pas aux quantités des milieux digestifs réels. De plus, les quantités différentes de litière dans les milieux digestifs rendaient impossible, en vue du traitement des données ultérieures, les dosages sur des masses fixées des prélèvements. En vu de minimiser la variabilité induite par les quantités différentes de litière ingérée, en plus de la variabilité interindividuelle « réelle » liée au métabolisme et à la physiologie des souris, les échantillons prélevés des contenus gastriques et intestinaux ont donc fait l'objet d'un traitement pré-analytique. Ce dernier consistait à introduire des antioxydants pour stabiliser les prélèvements et à extraire par une solution hydroalcoolique une fraction des milieux digestifs réels. La stabilisation consistait en l'ajout aux prélèvements d'un volume de BHT-éthanolique (1 µg μL^{-1}) correspondant aux 2/5ième de leur masse et aboutissant ainsi à une concentration finale en BHT du mélange

d'environ 0,29 µg g^{-1}. Les milieux gastriques et intestinaux ont ensuite été dilués 8,8 ± 3,8 et 10,2 ± 2,2 fois respectivement dans de l'eau ultrapure. Puis, ils ont été agités au vortex pendant 2 min et centrifugés (1000 g ; 10°C) pendant 10 min. Les surnageants, qui présentaient, pour la plupart des milieux gastriques une fine pellicule lipidique à leur surface, ont été prélevés et ont servi pour le dosage des produits d'oxydation (MDA et HAs).

III-2-8- Analyses et traitements statistiques

Les résultats sont exprimés comme une moyenne ± écart type des données recueillies sur au moins trois expérimentations indépendantes. Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel Statgraphics plus 5.1 (StatPoint Technologies, Warrenton, USA).

Pour l'évaluation des conditions digestives sur l'évolution de la lipolyse et des structures colloïdales au cours de la digestion, une analyse de variance (ANOVA) multiple a été effectuée sur les résultats obtenus dans les conditions gastriques ou intestinales simulées. Ceci avait pour objectif de tester les effets du temps d'incubation, du pH gastrique, de la présence de pepsine et éventuellement des conditions de mesure (avec ou sans SDS pour les mesures de DLS) ainsi que leurs interactions (sans indication contraire $p<0,05$). Ces analyses ont permis de classer les facteurs comme indiqué par le facteur F. Les ANOVAs à deux facteurs ont ensuite été effectuées séparément pour chaque temps d'incubation pour faire ressortir les effets du pH gastrique et de la présence de pepsine ainsi que leurs interactions. Finalement des ANOVAs à un facteur, suivies du test post-hoc des étendues multiples de Newman-Keuls au seuil de 0,05, ont été effectuées pour déterminer quelles conditions donnaient des résultats significativement différents des autres. L'homogénéité des variances a également été vérifiée et lorsque cette condition n'était pas respectée, le test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc et d'une analyse graphique (boite à moustache) a été effectué.

Lors de l'étude de l'oxydation, les différences entre les valeurs des échantillons témoins et essais ont été testées par une ANOVA avec un niveau de confiance de 95%. La différence des valeurs au cours de toutes les cinétiques d'oxydation en conditions digestives, quant à elle, a été évaluée par le test de comparaison multiple de Newman-Keuls à un seuil de confiance de 95%.

IV- RÉSULTATS ET DISCUSSION

La section résultats et discussion de ce manuscrit est présentée sous la forme de publications, rédigées en anglais dans des revues à comité de lecture, et de rédaction classique pour les résultats non publiés.

Cette thèse avait pour objectif de déterminer, *in vitro*, et de vérifier chez des souris, si les structures moléculaires, la taille et l'organisation initiale des gouttelettes des lipides alimentaires et leur évolution au cours de la digestion modulent la bioaccessibilité des acides gras insaturés et de certains de leurs produits d'oxydation. Pour ce faire des émulsions stabilisées par des émulsifiants de nature différente ont été produites. Elles ont ensuite été soumises à un protocole de digestion qui a été développé au cours de ce projet avec une partie conséquente consacrée à sa mise au point. Ce protocole, a servi à l'étude des évolutions des structures colloïdale et moléculaire des lipides au cours de la digestion, étape qui a necessité du développement méthodologique consistant en l'adaptation des protocoles d'analyse utilisés en routine au sein du laboratoire aux échantillons des milieux digestifs et à leur composition. Ce même processus a été adopté pour l'adaptation de ce protocole à la détermination de l'oxydation des lipides en condition digestive. Cette dernière adaptation consistait principalement en la gestion des échanges gazeux entre l'intérieur et l'extérieur du système digestif clos développé. L'étude de l'oxydation en fonction de la composition des milieux digestifs en lien avec sa teneur en pro- et anti-oxydants, de la nature des acides gras polyinsaturés de la phase dispersée, de la taille des gouttelettes et de la nature de l'interface des émulsions représente la majeure partie des résultats présentés. La troisième partie des résultats présente ceux issus d'expérimentations effectuées chez des souris afin de vérifier la validité des résultats obtenus *in vitro*.

Les résultats les plus importants générés au cours de cette thèse ont fait l'objet d'une discussion et ont été résumés et cloturent la section résultats.

IV-1- ÉVOLUTION DES STRUCTURES ET DE LA LIPOLYSE AU COURS DE LA DIGESTION IN VITRO DES ÉMULSIONS

IV-1-1- Mises au point et optimisations

Les résultats présentés dans cette partie ont nécessité de nombreuses mises au point et optimisations méthodologiques. Celles-ci ont porté essentiellement sur la mise en place des conditions digestives, le choix de la méthode d'extraction des lipides des milieux digestifs, l'optimisation des conditions de quantification de la lipolyse, et enfin l'adaptation du protocole digestif mis en place pour l'étude de l'oxydation au cours de la digestion *in vitro*.

IV-1-1-1- Évolution du pH lors de la digestion de l'émulsion colza-SAB

La mesure du pH comme la titration des acides gras libres formés au cours de la lipolyse sont des méthodes d'estimation de la lipolyse communément utilisées. Pendant la mise au point du protocole expérimental, la lipolyse a été évaluée en mesurant le pH intestinal dans 8 conditions. Celles-ci différaient par la présence ou non de pepsine dans le suc gastrique, l'ajustement du pH gastrique à 2,5 ou 4 pendant la phase gastrique et l'ajustement ou non, en fin de phase gastrique, du pH à 6 avant ajout des sucs pancréatico-biliaires.

Les évolutions de pH au cours de la digestion gastro-intestinale *in vitro* de l'émulsion sont présentées sur la figure 14.

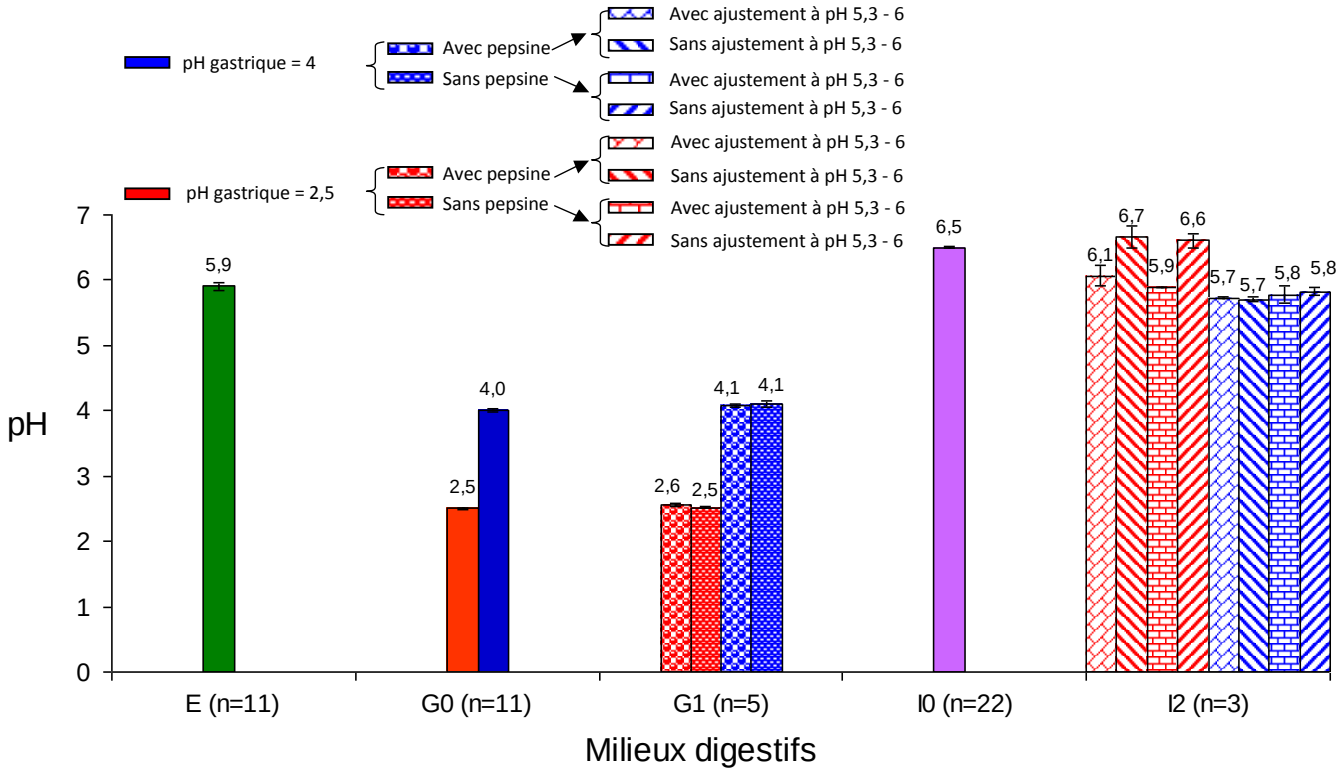


Figure 14 : Variation de pH des milieux digestifs au cours du protocole expérimental

Généralement, pour des conditions expérimentales identiques, les échantillons ont des valeurs de pH similaires. Après une heure de digestion gastrique, le pH ne varie pas, que ce soit en présence ou en absence de pepsine. En conditions intestinales, des variations de pH sont observées selon les conditions expérimentales. Le pH des milieux intestinaux issus des milieux gastriques à pH 4 sont identiques, indépendamment de la présence ou de l'absence de pepsine dans le milieu gastrique et de l'ajustement ou non, en fin de digestion gastrique, du pH à 5,3 - 6. Par contre, on note, en fonction de cette étape d'ajustement (et non de la présence ou non de pepsine) une différence de pH pour les milieux intestinaux issus de milieux gastriques à pH 2,5. L'ajustement conduit à une diminution de pH presque comparable à celle obtenue pour les milieux issus de milieux gastriques à pH 4, contrairement à l'absence d'ajustement qui conduit à l'obtention d'un pH comparable au pH du milieu intestinal avant digestion (6,5). Deux hypothèses pourraient être avancées. L'une étant que, sans l'étape d'ajustement, la pepsine encore active dans le milieu gastrique aurait le temps d'inactiver de manière partielle les lipases pancréatiques, par son activité protéolytique, avant l'ajustement du pH à 6,5 (pH où la pepsine est irréversiblement inhibée). La seconde hypothèse, la plus plausible, serait l'inhibition irréversible des lipases pancréatiques par les faibles pH gastriques comme l'ont rapporté (Miled *et al.*, 2000) et (Carrière *et al.*, 2000) pour des pH inférieurs ou égaux à 4,5. En effet, après ajout, au milieu gastrique en fin d'incubation, des sécrétions pancréatico-biliaires et avant ajustement du pH à 6,5, le pH du mélange est de 4,6 pour les milieux gastriques à pH 2,5 alors qu'il est de 5,6 pour les milieux gastriques à pH 4. Cette observation a conduit à la conclusion d'ajustement systématique du pH en fin de phase gastrique à 6 avant ajout des sucs pancréatico-biliaires.

IV-1-1-2- Choix de la méthode d'extraction des lipides

Deux méthodes d'extraction des lipides ont été évaluées afin de choisir celle qui permettait d'obtenir une bonne extraction de tous les lipides des milieux de façon reproductible. La première méthode évaluée est celle de Bligh & Dyer (Bligh and Dyer, 1959). Elle présente comme avantage de permettre une extraction optimale à froid de toutes les classes lipidiques, d'utiliser de faibles quantités de solvants et d'être facile à mettre en œuvre. La seconde méthode testée, impliquant également une extraction à froid, est celle utilisant l'hexane et l'isopropanol (Hara and Radin, 1978).

Dans un premier temps, afin de vérifier la représentativité des lipides extraits en terme de composition en acides gras par rapport à celle de l'huile, les rendements d'extraction pour

la méthode hexane-isopropanol ont été déterminés pour des émulsions de deux manières. Le rendement a été déterminé soit par pesée soit avec un étalon interne la trimarganine ($TriC_{17}$) après CPG-FID. Le protocole utilisé est schématisé à la figure 15.

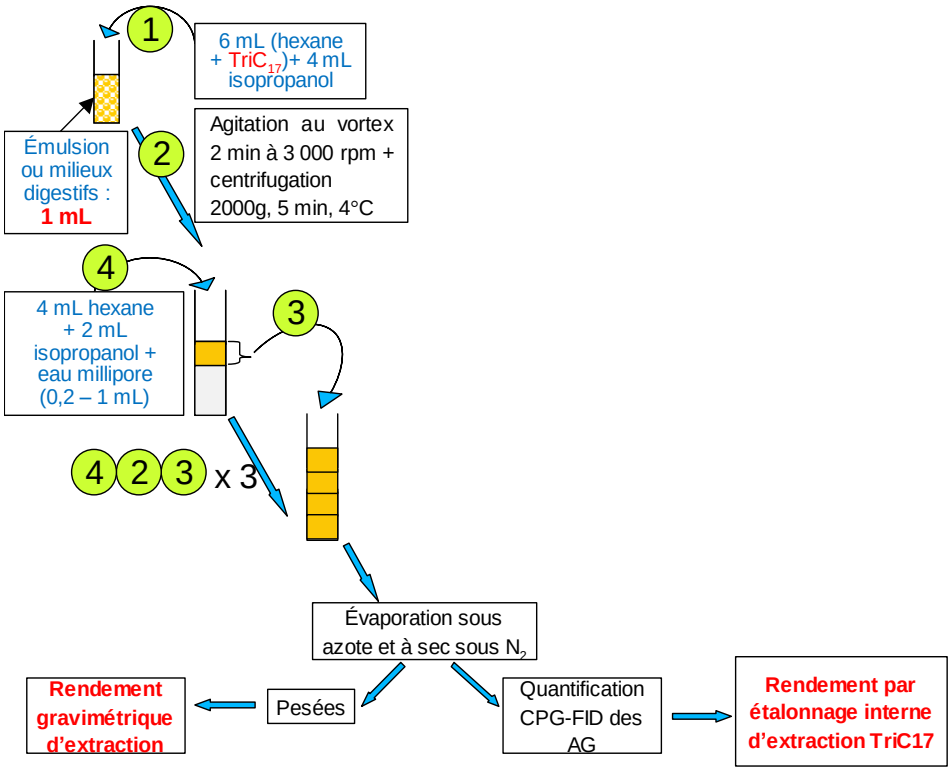


Figure 15 : Protocole de caractérisation de la méthode d'extraction hexane-isopropanol

La figure 16 présente les rendements obtenus et leur répétabilité.

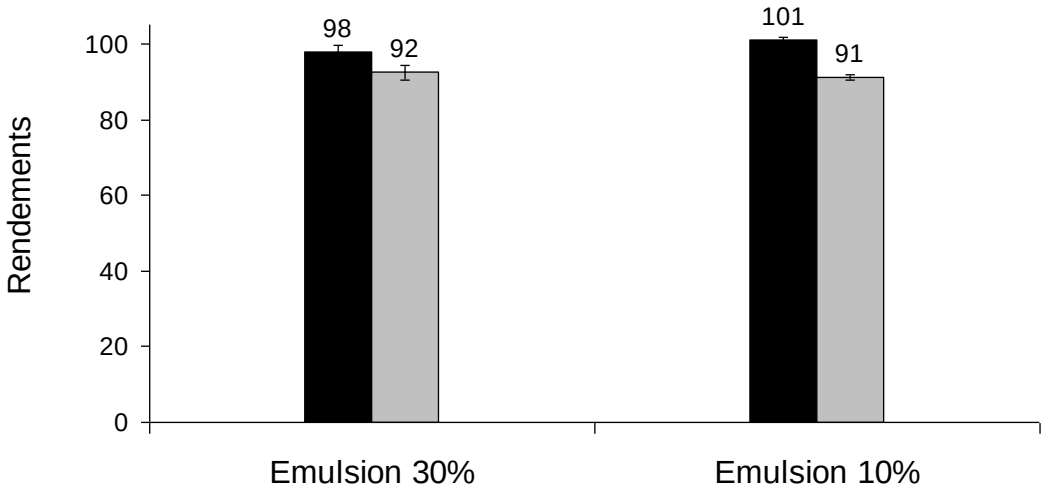


Figure 16 : Rendements d'extraction, gravimétrique (noir) et par étalonnage interne à la trimargarine (gris), des lipides des émulsions obtenus par la méthode hexane-isopropanol. (n=3)

Cette figure nous montre que l'extraction des lipides avec un mélange hexane/isopropanol conduit à des rendements proches quelle que soit la teneur en lipides de l'émulsion. Si ce rendement est bon pour des lipides constitués uniquement de TAG, il semblerait qu'il le soit moins pour l'extraction des phospholipides (Certík *et al.*, 1996) ou des produits d'hydrolyses des TAG tels les MAG et les AGL dont l'extraction ne serait pas totale.

Cette hypothèse a été vérifiée dans un second temps en comparant les rendements gravimétriques obtenus par les méthodes hexane-isopropanol d'une part et Bligh & Dyer d'autre part après extraction d'échantillons constitués uniquement de TAG (émulsion d'huile de colza) ou contenant ses produits d'hydrolyse (Milieux intestinaux après 20 heures de digestion).

Tableau VII : Rendements gravimétriques d'extraction des lipides d'émulsions et de milieux digestifs obtenus par les méthodes hexane-isopropanol vs Bligh & Dyer

	E0 10%	Milieux intestinaux (après 20 h de digestion)
Hexane-isopropanol	93,6 ± 1,1	82,8 ± 8,2
Bligh & Dyer	90,6 ± 3,1	84,8 ± 11,3

Ce tableau montre que la méthode d'extraction utilisée ne modifie pas les rendements gravimétriques des lipides extraits bien que la répétabilité soit moins bonne pour les milieux intestinaux, probablement du fait de la variabilité inhérente au protocole digestif. Afin de vérifier si cette absence d'effet de la méthode d'extraction se retrouve également au niveau de la composition en classes lipidiques des extraits, cette dernière a été déterminée par HPLC-DDL (tableau VIII).

Tableau VIII : Composition en classes lipidiques des extraits de milieux intestinaux par les méthodes hexane-isopropanol et Bligh & Dyer

	Quantités en classes lipidiques ($g\ g^{-1}_{lipides\ extraits}$) (n = 3)	
	Hexane-Isopropanol	Bligh & Dyer
TAG	0,12 ± 0,05	0,13 ± 0,01
DAG	0,18 ± 0,06	0,16 ± 0,02
MAG	0,10 ± 0,03	0,08 ± 0,01
AGL	0,32 ± 0,08	0,27 ± 0,03

Il ressort de ce tableau que, comme pour les rendements d'extraction, les quantités des classes lipidiques, en g g^{-1} de lipides extraits, ne sont pas différentes, quelle que soit la méthode utilisée bien que la variabilité soit légèrement plus importante pour les extraits hexane-isopropanol comparés aux extraits Bligh & Dyer. Le critère de choix de la méthode d'extraction à utiliser s'est donc basé beaucoup plus sur la facilité de mise en œuvre de la méthode. En effet, il est plus aisé de contrôler les rapports volumiques de solvant dans le milieu d'extraction, et donc des séparations de phases, avec la méthode Bligh & Dyer, contrairement à la méthode hexane-isopropanol. Pour cette dernière, les volumes de phases séparées ne sont pas constants, ce qui pourrait affecter l'extractibilité des lipides. La méthode de Bligh & Dyer a donc été retenue pour l'extraction des lipides des milieux digestifs.

IV-1-1-3- Identification et quantification des classes lipidiques par HPLC

L'identification des classes lipidiques a été effectuée à l'aide de solutions de standards de classe lipidiques.

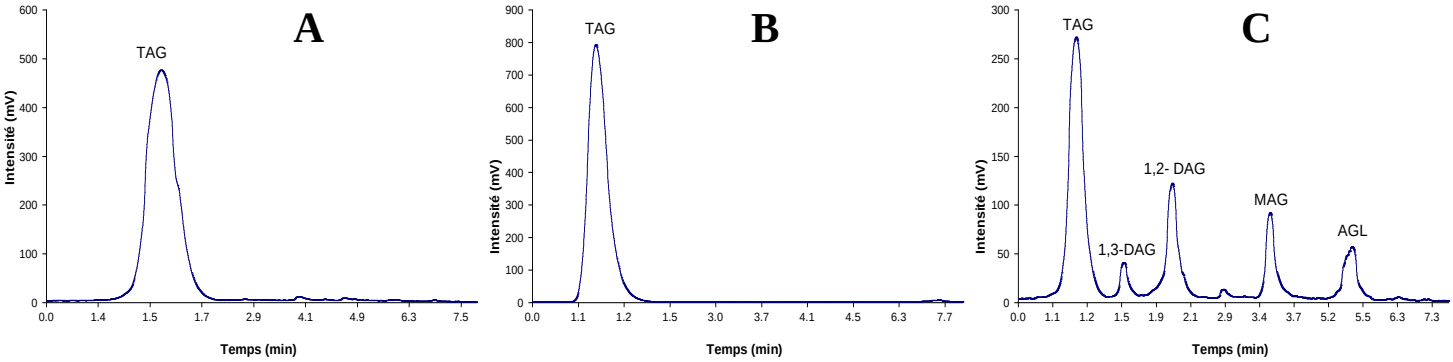


Figure 17 : Profils chromatographiques obtenus après analyse par HPLC-DDL des échantillons de lipides extraits des émulsions (A) et des milieux gastriques (B) et intestinaux (C) après une heure et 5 heures d'incubation respectivement

Les lipides contenus dans les émulsions sont composés presque exclusivement de TAG dont la structure moléculaire n'évolue pas au cours de la phase gastrique du fait de l'absence dans ce compartiment de lipase. Dans la phase intestinale, de nouvelles classes lipidiques, issues de l'hydrolyse des TAG (DAG, MAG et AGL) apparaissent. L'utilisation des solutions standards d'isomères 1,2- et 1,3- des DAG, montre que la *HPLC* permet de séparer les isomères de DAG, l'isomère 1,3- étant élué plus rapidement que l'isomère 1,2-. Etant donné qu'il n'y a pas d'activité lipolytique dans les milieux gastriques, l'évaluation de la lipolyse n'a porté que sur les lipides extraits des milieux intestinaux.

La quantification des classes lipidiques a été effectuée par étalonnage externe. Cette étape a nécessité une modification des conditions chromatographiques d'une part et un choix du meilleur modèle d'ajustement de la courbe étalon d'autre part.

Pour la détermination du modèle d'ajustement et des concentrations en classes lipidiques des échantillons à injecter, les courbes étalons de gammes contenant les classes lipidiques en quantités équimassiques ont été représentées entre 0 et 3, 5 et 6 µg injectés et ajustées avec des modèles polynomiaux d'ordres variant de 2 à 4 (figure 18). Le meilleur modèle à été choisi en fonction de trois critères : l'absence de point d'inflexion dans la courbe étalon, une proximité du R^2 de 1 et donc un meilleur ajustement des points sur la courbe, et enfin la plage de gamme doit être la plus large possible.

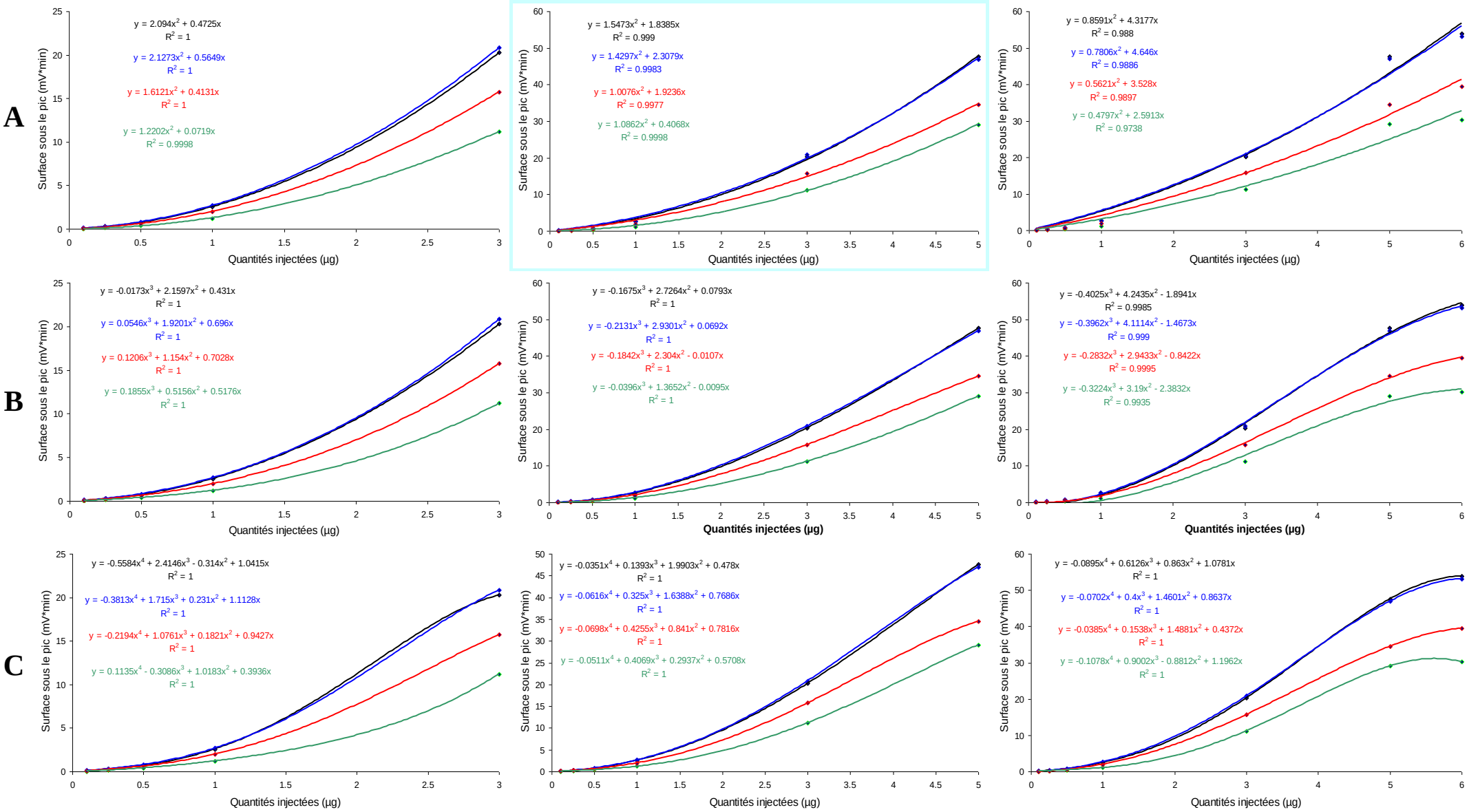


Figure 18 : Courbes étalons des TAG (noir), DAG (vert), MAG (bleu) et AGL (rouge) tracées pour des quantités injectées comprises de 0,1 à 3 (1ère colonne), 5 (2ième colonne) ou 6 µg (3ième colonne) suivant les modèles polynomiaux d'ordres 2 (A), 3 (B) ou 4 (C)

En comparant les profils et les R^2 des différentes courbes en fonction de l'ordre du modèle polynomial appliqué et de la largeur de la gamme étalon, on remarque que malgré un R^2 de 1, le critère d'absence de point d'inflexion n'est pas respecté pour le modèle polynomial d'ordre 4. Pour le modèle d'ordre 3, le R^2 est inférieur à 1 pour la plage de 0,1 à 6 µg en plus de la présence de point d'inflexion, et même si on note entre 0,1 à 5 µg un R^2 de 1 la courbe tend à s'incurver vers le point haut de gamme. Enfin, pour le modèle d'ordre 2, à partir de 5 µg injectés et plus, les points ne sont pas ajustés à la courbe d'étalonnage. Le modèle polynomial d'ordre 2 donne ainsi pour des quantités comprises entre 0,1 et 5 µg la meilleure courbe en prenant en compte les critères d'absence de point d'inflexion dans la relation entre la quantité de classes de lipides injectée et la surface sous les pics sur toute la plage de gamme qui doit être la plus large possible. Toutefois, par précaution, la quantité maximale de classe de lipides à injecter en vue d'une quantification a été fixée à 4 µg.

La méthode initialement mise en place consistait en à la séparation des échantillons maintenus à la température de 10 °C. Dans ces conditions, nous avons constaté des dérives importantes de la pente des courbes étalons dues à la cristallisation de certains lipides dans les extraits lipidiques. En vue d'améliorer la reproductibilité des gammes étalons la température d'analyse a été fixée à 20 °C. La figure 19 présente les courbes moyennes des courbes étalons tracées sur 7 jours dans ces conditions.

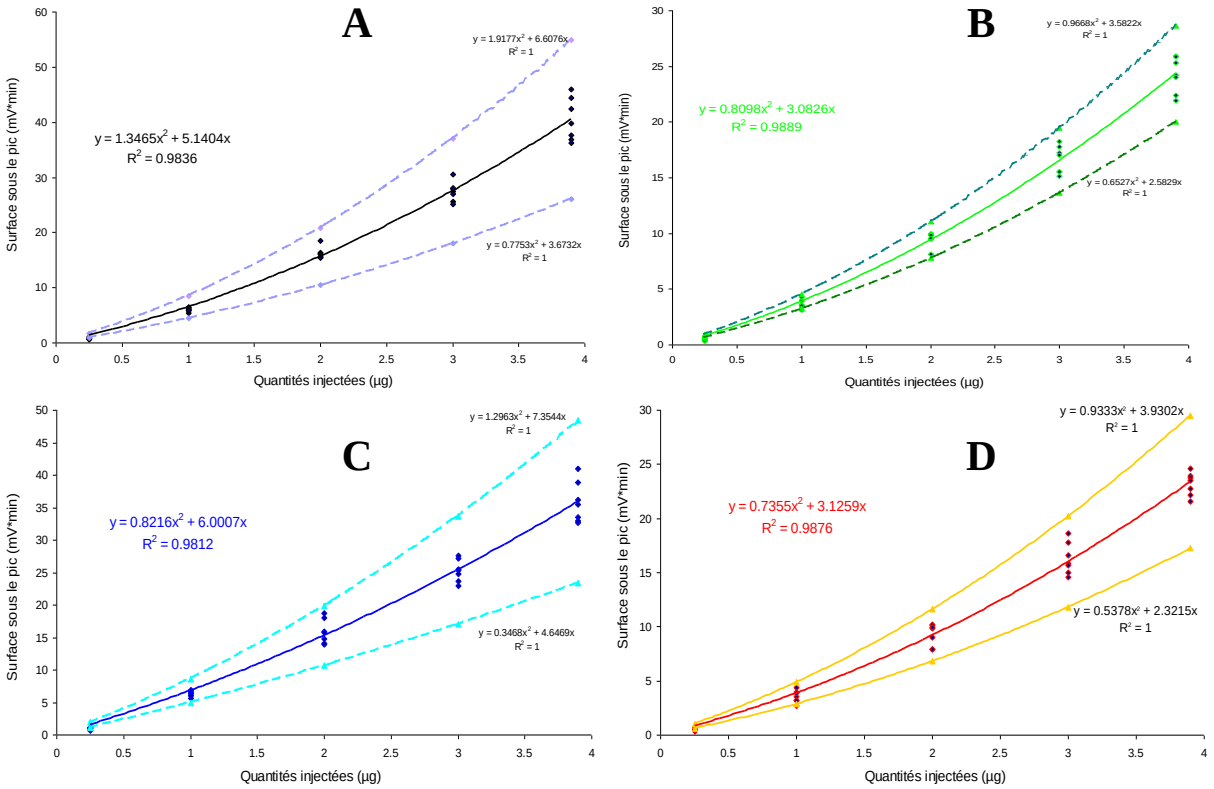


Figure 19 : Courbes moyennes avec plage d'écarts-types des courbes étalons des TAG (A), DAG (B), MAG (C) et AGL (D)

Par comparaison avec les données obtenues à 10 °C (données non présentées), l'augmentation de la température de 10°C a conduit à un gain non négligeable en termes de reproductibilité.

Ainsi, la quantification des classes de lipides suite à la lipolyse des TAG a été réalisée dans les conditions décrites précédemment (Fig. 20).

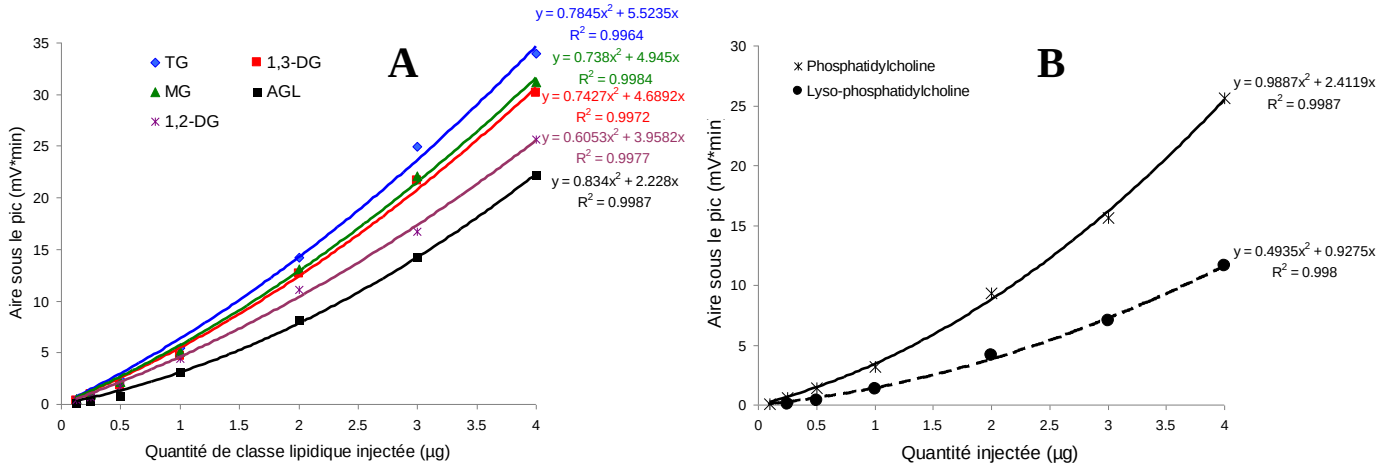


Figure 20 : Courbes étalon utilisées pour la quantification des classes lipidiques neutres (A) et polaires (B) lors du suivi de la lipolyse

Les équations de ces courbes étalons ont permis de calculer, par interpolation, la teneur en classes lipidiques dans les échantillons.

IV-1-1-4- Choix du moyen de représentation des résultats granulométriques dans les milieux gastriques

La distribution de taille des gouttelettes lipidiques peut être représentée, entre autre, soit en volume soit en surface. Pour choisir le mode de représentation le mieux adapté à nos conditions expérimentales, les deux modes ont été comparés. La figure 21 présente un exemple de distribution en taille des gouttelettes lipidiques obtenu pour un des milieux gastriques représenté en volume et en surface.

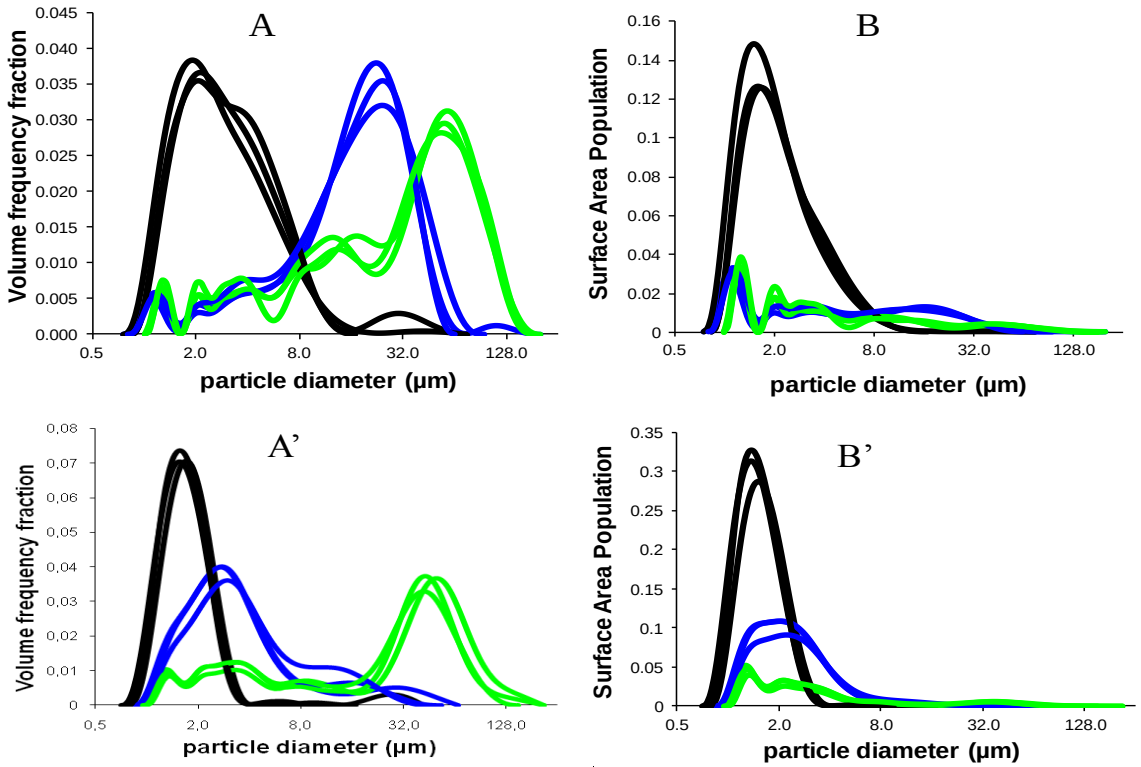


Figure 21 : Distributions en volume (A) et en surface (B) de milieux gastriques non dilués (A et B) et dilués (A' et B') dans du SDS : (▬) émulsion native ou (▬) milieu gastrique avant incubation et (▬) après 1 heure d'incubation.

Comme on peut le constater, l'expression de la distribution de taille des gouttelettes en volumes permet de mieux apprécier les phénomènes de floculation (comparaison des profils obtenus avec et sans SDS) et de coalescence (comparaison des profils obtenus avec SDS). Cette observation confirme l'hypothèse selon laquelle le $d_{4,3}$ est plus sensible à la présence de larges particules que le $d_{3,2}$, et de ce fait, est plus sensible pour la caractérisation de l'agrégation des gouttelettes lipidiques (McClements, 2005). Ainsi, les résultats granulométriques des milieux gastriques seront présentés en volume.

IV-1-1-5- Choix du moyen de représentation des résultats granulométriques dans les milieux intestinaux

Comme pour le milieu gastrique, les modes de représentation des résultats ont été comparés. La figure 22 présente un exemple de distribution obtenu pour deux des milieux intestinaux représentés en volume et en surface.

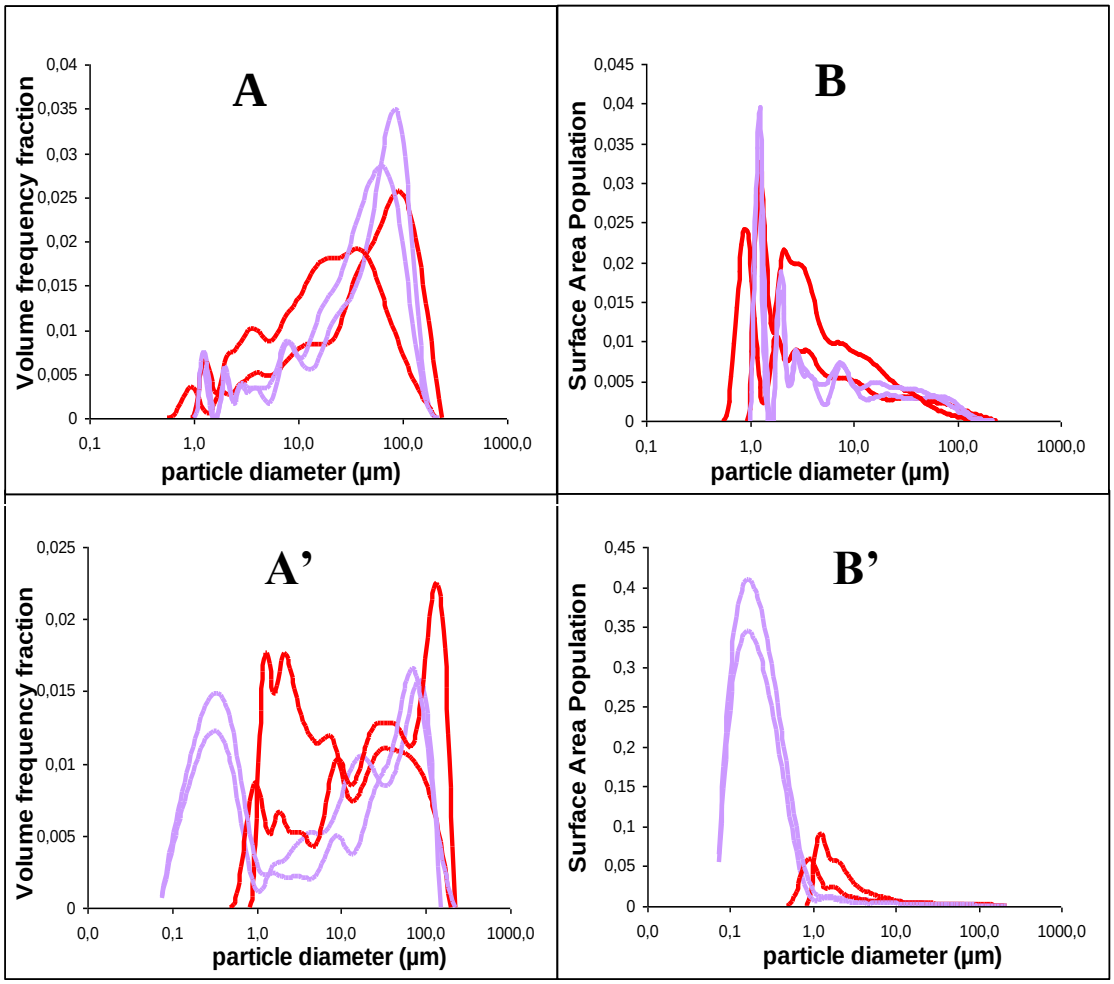


Figure 22 : Distributions en volume (A) et en surface (B) de milieux intestinaux non dilués (A et B) et dilués (A' et B') dans du SDS : ( ) milieu intestinal avant incubation et ( ) après 2 heures d'incubation.

La reproductibilité de la distribution de taille est beaucoup moins bonne que celle obtenue avec les milieux gastriques. Pour les échantillons non dilués dans du SDS, la représentation de la distribution en volume et en surface ne permet pas de mettre en évidence une formation significative de structures de très petites tailles qui est normalement attendue lors de la digestion intestinale. La dilution dans le SDS, quant à elle, permet de mieux apprécier la diminution de taille des gouttelettes lipidiques et/ou de révéler la présence de

structures nouvellement formées. L'apparition de ces structures après dilution dans le SDS montre l'existence du phénomène de floculation dans les milieux intestinaux. Diluée dans le SDS, la distribution en volume est multimodale alors que celle en surface est monomodale. De plus, la distribution en surface permet de mieux caractériser la diminution de taille des gouttelettes lipidiques au cours de la digestion intestinale. En effet, on peut noter une augmentation significative de l'aire sous les pics quand on passe du milieu I0 (contenant, *a priori*, l'émulsion non digérée) au milieu I2 (contenant, *a priori*, l'émulsion digérée constituée de fines gouttelettes et de structures nouvellement formées). Au vu de toutes ces informations, il a été choisi de n'utiliser, pour interprétation, que les résultats granulométriques intestinaux obtenus après dilution des milieux dans le SDS 1% et en utilisant la représentation en surface.

IV-1-2- Évolution au cours de la digestion *in vitro* de l'émulsion colza-SAB

IV-1-2-1- (Article 2) Évolution de la taille et de l'organisation des gouttelettes lipidiques ainsi que de la lipolyse

Gastric conditions control both the evolution of the organization of protein-stabilized emulsions and the kinetic of lipolysis during in vitro digestion

***Food & Function*, article sous presse (DOI: 10.1039/c2fo30031a)**

H.B. Kenmogne-Domguia, A. Meynier *, M. Viau, G. Llamas and C. Genot

INRA, UR1268 Biopolymères Interactions Assemblages, BP71627, F-44316 Nantes, France

Gastric conditions control both the evolution of the organization of protein-stabilized emulsions and the kinetic of lipolysis during *in vitro* digestion

Hernan Brice Kenmogne-Domguia, Anne Meynier*, Michèle Viau, Geneviève Llamas, Claude Genot

** INRA, UR1268 Biopolymères Interactions Assemblages ; BP 71627 F 44316 Nantes France; Fax:+ 33 2 40 67 50 84; Tel: +33 2 40 67 50 84, E-mail: anne.meynier@nantes.inra.fr*

Received 16 Feb 2012, Accepted 25 Jul 2012, first published on the web 30 Jul 2012
DOI: 10.1039/c2fo30031a

During digestion, lipids undergo modifications of their colloidal and molecular structures, which depend on the digestive conditions and the composition of the digestive juices. The aim of this work was to evaluate whether gastric pH and pepsin modulate the colloidal evolution and the bioacessibility of fatty acids of an oil-in-water emulsion stabilized by a protein during in vitro digestion. The fate of BSA-stabilized rapeseed oil-in-water emulsion during gastric phase at pH 2.5 or 4.0 with or without pepsin and its consequences on intestinal lipolysis was measured in the simulated gastric and duodenal conditions. The pH had limited impact but pepsin favoured flocculation and coalescence of the droplets, modulating the early stage of lipolysis but not its final extent.

1 Introduction

Lipids play a dual role in the western diet. Over-consumption of lipids is frequently related to metabolic disorders and obesity, while consumption of unsaturated lipids, particularly n-3 is often associated with the prevention of various diseases such as cardiovascular disease and inflammation. [1–5]

The emulsification of lipids facilitates the delivery and absorption of lipophilic nutrients, such as n-3 fatty acids, [6] or carotenoids. [7] Emulsions can be designed to behave differently upon digestion and thereby to adjust the release of beneficial nutrients. This better control of lipid bioavailability through the formulation of emulsions is a key challenge for optimising the nutritional value of our diet.[4,8–12]

To be used by the body, dietary fats must be converted into absorbable simple molecules,

namely monoacylglycerols (MAG), free fatty acids (FFA), free cholesterol and lysophospholipids. This conversion occurs by the combined actions, in the conditions of the gastrointestinal tract (GIT), of preduodenal and pancreatic lipases and phospholipase A2, [13] secreted during digestion. In healthy adults, pancreatic lipase takes a major part in the hydrolysis of dietary triacylglycerols (TAG). [14–17] Its activity depends primarily on the oil–water interfacial area which can be considered as the ‘‘true substrate’’ for the lipolytic enzyme. [18,19]

Indeed, lipids are ingested either as a continuous phase, as for sample in culinary oils, butter, margarines or adipose tissues or ready dispersed as droplets or colloidal structures in more or less hydrated matrices, as they are found in milk, dairy desserts, mayonnaise, sauces and dressings. This supramolecular organization of the dietary lipids affects the lipid surface area directly in contact with the digestive fluids. It modifies their digestion and intestinal absorption. For instance, in Human, pre-homogenization of fat increased the absorption of long chain PUFA. [6] Additionally, a decrease of the diameter of the lipid droplets (0.7 mm vs. 10 mm) increased the rate of lipolysis in the duodenum and delayed the TAG peak in the serum. [14,15]

When dietary lipids are ingested in bulk, they undergo a coarse emulsification under the action of chewing and peristalsis. The phenomenon is favoured thanks to the adsorption at the newly created oil–water interfaces of surface-active molecules, which are indeed naturally present in the foods (proteins and complex lipids), and in the digestive fluids originating from the desquamation of the digestive mucosa. The emulsification of TAG and the formation of small-size colloidal structures therefore occurs progressively in the bolus and in the chyme. [20,21] This dispersing effect is more specifically intense in the intestinal compartment under the action of bile salts. The products of lipolysis also contribute to the formation of mixed micelles and vesicles in the intestinal compartment thanks to their tensio-active and phase-forming properties. [22] In contrast to these phenomena that contribute to enhance the access of the lipase to its substrates, the lipid droplets already present in the foods may undergo partial destabilisation. This phenomenon is governed by the common laws of evolution of colloidal systems under environmental constraints, including changes in pH, ionic strength, shear stress, temperature, etc. [23] Flocculation and coalescence of the lipid droplets of emulsified food matrices can be therefore observed in gastric conditions. [24,25] The extent of the destabilization depends on the nature of the interfacial film, [23] protein-stabilized structures being highly affected by these factors. The underlying mechanisms comprise neutralization and screening of the electrostatic charges of protein emulsifiers due to pH and ionic strength,

modulating the electrostatic repulsions or attractions of the lipid droplets. [26] In vitro study has also shown that the ionic strength affects the physical stability of digestive media containing emulsions and the activity of pepsin. [24] Nevertheless, this study was carried out at pH 1.7, a pH that is not representative of feeding conditions. Although, depending on the nature of ingested foods, the gastric pH increases post-ingestion from the fasting values (1.7–2.9) to a value comprised between 4.0 and 6.7 before returning to the baseline level from 2 to 4 hours after the meal. [14,15,27,28] The evolution of lipid structures during the gastric phase and lipase activity in the intestinal conditions also depend on the presence in the digestive media of various, active substances and enzymes. In conditions simulating the gastric medium, mucin induces flocculation of lipid droplets through bridging and depletion phenomena, with intensity depending on the ionic strength of the medium and the charge of the emulsifier. This may lead to further coalescence of the droplets. [24,29,30] Pepsin hydrolyses proteins containing peptidic bonds involving aromatic or hydrophobic L-amino acids with optimal pH comprised between pH = 1.0 and 4.0. [31,32] At pH 2.0 it exhibits its maximum activity, and about 70% at pH 4.5. [33] In gastric conditions, it leads to partial destabilisation of protein-stabilized emulsions, with effects depending on the nature of the emulsifying protein and ionic strength. [24,34,35] In intestinal conditions, further modifications of the structure of the emulsions occur, under the combined actions of the bile salts displacing proteins from the interfaces and the lipolysis. [36] Several recent reviews have highlighted that emulsion structure and stability can modulate lipid digestion and in fine absorption of nutrient such as fatty acids. [9,12,37]

However, to our knowledge, the role played by pepsin and pH variation in the stomach, during digestion, on the evolution of the lipid structures of protein-stabilized oil-in-water emulsions and the further release of the absorbable lipid species is not well characterized. The aim of this paper is to evaluate whether gastric pH and pepsin modulate the colloidal evolution and the bioacessibility of fatty acids of an oil-in-water emulsion stabilized by a protein. BSA-stabilized oil-in-water emulsion was submitted to in vitro simulated gastric conditions including early (pH = 4.0) and latter (pH = 2.5) post-prandial pH conditions and the presence or the absence of pepsin. The resulting media were then diluted in a medium simulating the intestinal step of digestion. Evolution of the supramolecular (dispersion degree) and molecular level (lipolysis) were assessed throughout the in vitro digestion.

2 Materials and methods

2.1. Materials

Rapeseed oil (Lesieur, Fleur de Colza ®) was purchased from a local supermarket. BSA (Cohn Fraction V Powder, 95–98%) was purchased from MP Biomedical. Chemicals reagents and solvents were of analytical grade: potassium chloride (99.5%, Merck), sodium chloride (100%, VWR Prolabo), sodium hydrogen bicarbonate (99.5%), hydrogen chloride (37%, Carlo Erba), calcium chloride (97%, Sigma), chloroform for HPLC (Carlo Erba), methyl alcohol for HPLC (99.9%, Carlo Erba), ammonia solution (30%, Carlo Erba), triolein (99.9%, Supelco), 1,2-dioleoyl-rac-glycerol (99.5%, Supelco), 1,3-diolein (99.9%, Supelco), 1-monooleoyl-rac-glycerol (99.9%, Supelco) and oleic acid (99%, Sigma). SDS (99%) was purchased from Janssen Chimica. Mucin (type 2 from porcine stomach), pepsin (from porcine gastric mucosa, 2500–3500 units mg^{-1} protein), pancreatin (porcine pancreas, 8XUSP specification), lipase (type II, crude from porcine pancreas), and bile extract (porcine) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Company (Saint-Quentin Fallavier, France). The bile extract contained 1–5% hyodeoxycholic acid, 0.5–7% deoxycholic acid, 0.5–2% cholic acid, 10–15% glycodeoxycholic acid and 3–9% taurodeoxycholic acid as stated by the supplier.

2.2. Emulsion preparation

Our target was an oil–water emulsion, stabilized by a protein (BSA), and characterized by a narrow monomodal distribution of droplet sizes allowing its observation with light microscopy. BSA (5 g L^{-1}) was first stirred over night at 4 °C in a saline solution (120 mM NaCl, 6 mM $CaCl_2$ and 5 mM KCl) to ensure the rehydration and solubilisation of the protein. The solution was equilibrated at room temperature for at least 1 h before use. Rapeseed oil was used as the oily phase. The oil (mass fraction: 0.3) was then dispersed at 15 000 rpm for 3 min in the protein solution with a rotor stator (Heidolph SilentCrusherM, no: 595- 06000-00-2, Schwabach, Germany) equipped with a 12 mm diameter rod (Heidolph Type 12 F/NM: 11-001-596-06-0). The coarse emulsion was refined by homogenisation at 60 bars for 10 min through a low-pressure valve homogenizer (A0812W-A-CD, Stansted Fluid Power, UK). The resulting fine emulsion was diluted to three times its initial volume with the saline solution (Table 1) to obtain the final emulsion that contained an oil mass fraction of 0.1.

The concentration of unadsorbed proteins in the aqueous phase was measured as previously

described. [38] Briefly, aliquots of emulsions were centrifuged (5000 × g, 45 min, 20 °C) to separate the aqueous phase from the oil droplets. The aqueous phase was collected and filtered through 0.45, 0.20 and 0.10 mm cellulose acetate filters (Minisart High-Flow, Sartorius, Germany) to remove the residual small oil droplets. The amount of unadsorbed proteins was determined according to the method described by Markwell et al. [39].

2.3. *In vitro* digestion model

To simulate gastric and intestinal phases, we used an in vitro model of digestion based on previous works related to the bioaccessibility of lipophilic compounds. [40,41] The compositions of the simulated digestive fluids are given in Table 1. For the gastric step of the digestion, 8.44 mL of simulated gastric fluid (SGF) were added to 15 mL of native emulsion. After pH adjustment to 2.5 or 4.0 with HCl, the medium was incubated in the dark for 1 h at 37 °C under magnetic stirring (400 rpm). To simulate the intestinal step of the digestion, the pH was displaced to around 6.0 with small drops of $NaHCO_3$ solution before the sequential addition of 5.63 mL of reconstituted bile extract and 15.63 mL of pancreatic juice to the gastric media. This constituted the so-called: simulated intestinal fluid (SIF). The pH was finally adjusted to 6.5 with $NaHCO_3$. The media was then incubated at 37 °C under magnetic stirring (400 rpm).

Table 1. Composition of the simulated digestive juices

Simulated gastric fluid					
Mucin	Pepsin	KCl	$CaCl_2$	NaCl	
g L^{-1}	g L^{-1}	mM	mM	mM	
2.67	6.67	5	6	120	
Simulated intestinal fluid					
Pancreatin	Pancreatic lipase	Bile extract	KCl	$CaCl_2$	NaCl
g L^{-1}	g L^{-1}	g L^{-1}	mM	mM	mM
1.12	0.56	18.63	5	6	120
Pancreatic juice					

2.4. Measurement of particle size distribution by static light scattering (SLS)

The particle size distribution (PSD) in the native emulsions and in the gastric and intestinal media was determined by static laser light scattering with a Mastersizer S (Malvern, UK). The software automatically gives the best fit between the experimental measurements and

predictions made with Mie light scattering theory. The refractive indices used for modeling were 1.475 (real part) and 0.01 (imaginary part) for rapeseed oil, and 1.331 for water. [42] Results were presented as the distribution of the particle sizes expressed in fractions of the total volume or of the total surface. The mean volume diameter, or volume/weighted diameter, is defined as $d_{4,3}$ (µm) = $\Sigma n_i d^4_i / \Sigma n_i d^3_i$ where n_i is the number of particles of diameter d_i (mm). It was used to characterize the native emulsion and the gastric media. The volume/surface average diameter is defined as $d_{3,2}$ (µm) = $\Sigma n_i d^3_i / \Sigma n_i d^2_i$. The specific surface area (S, m^2/g oil) can be easily deduced from $d_{3,2}$: $S = 6/d_{3,2}$. S and $d_{3,2}$ were used to characterize the intestinal media because interfacial area is a main factor for lipase activity. All measurements were performed after dilution of the media in filtered water directly in the instrument's sampler until around 10–15% obscuration. The flocculation or coalescence of the oil droplets during simulated digestion was assessed by the comparison of particle size distributions obtained before and after dilution (1/6) of the sample with a solution of SDS (1% w/w).

2.5. Optical microscopy

Emulsions and digestive media were diluted in ultrapure water and gently agitated in an Eppendorf tube before analysis to ensure homogeneity. A drop of the solution was then placed on a microscope slide and covered by a cover slip. The microstructure was observed using optical microscopy (Zeiss microscope Axioskop 2, Le Pecq, France). The images were acquired at a resolution of 1360 x 840 with a Prosilica camera (Model: EC 1350, SN: 02-1045B-05179, Alliance vision, Burnaby, Canada) and an objective magnification of 10 x.

2.6. Isolation and characterization of micellar and vesicular structures

The largest droplets obtained after the simulated intestine digestion were separated by centrifugation (5000 x g for 45 min at 4 °C). The bottom fraction, containing smaller lipid droplets, micelles and/or vesicles, was taken off with a syringe, and filtered on an acetate cellulose filter (0.22 mm pores). Filtered solutions were analyzed, without dilution before measurement, by dynamic light scattering (DLS) with a nanosizer Malvern instrument (Nanosizer-S ZS, MAL500385). Measurements were carried out at 37 °C in backscattering mode.

2.7. Lipid extraction

Total lipids were extracted from 1 mL of the native emulsions or of the digestive media according to the Bligh and Dyer procedure with minor modifications. [43] The first step enables extraction of lipids thanks to a monophasic mixture of $CHCl_3/CH_3OH/H_2O$ (1/2/0.8; v/v/v). Two drops of HCl (1 M) were previously added to the intestinal media to provoke the inactivation of the intestinal lipases (pH < 2) and the protonation of free fatty acids insuring their partitioning in the chloroform phase. In the second step, the chloroform phase dissolving the lipids is separated from the aqueous phase due to the formation of a biphasic system with the mixture of chloroform, methanol and water (2/2/1.8; v/v/v). The chloroformic lower phase was removed from tubes and replaced by an equivalent volume of chloroform. Tubes were centrifuged and the chloroformic phase removed. These last steps were duplicated and all the organic lower phases pooled. Finally, after evaporation of the solvent under reduced pressure, residual chloroform was evaporated to dryness under nitrogen. Total lipids were determined gravimetrically.

2.8. Lipolysis : release of absorbable lipid species

Lipolysis was assessed by separation of TAG and lipid hydrolysis products, namely diacylglycerols (DAG), MAG and FFA by normal phase HPLC and their quantification with an evaporative light scattering detector (ELSD).

2.8.1. Chromatographic conditions

HPLC analysis was carried out with a modular UltiMate® 3000 RS HPLC System (Dionex, France) coupled to an Evaporative Light Scattering Detector Sedex 85 (Sedere S.A., Alfortville, France). Chromeleon® Chromatography Management Software (Dionex) was used for system control and data processing. HPLC Dionex RS-LC Ultimate 3000 (Voisins Le Bretonneux, France) equipped with two pumps, a gradient system, a degasser module and an automatic injector with a 100 mL sample loop. The analytical column was packed with a silica normal-phase (Prevail Silica 3 mm Grace: 150 mm x 4.6 mm I.D., Alltech Associates Inc., Lokeren, Belgium). The chromatographic separation was carried out using a multistep binary linear gradient according to the following scheme: t0 min: 0%B, t8 min: 50%B, t12: 100%B, and finally isocratic conditions (100%B) for 3 min. The mobile phase was brought back to the initial conditions and the column was allowed to equilibrate until the next injection. The total chromatographic run time was 20 min per sample. Eluent A consisted of

chloroform and eluent B was composed of $CH_3OH/CHCl_3/NH_4OH$ (460/5/35; v/v/v). The flow rate was set at 1.5 mL min^{-1}. Lipid classes were detected and quantified by an evaporative light scattering detector (ELSD, Sedex model 85, Sedere, Alfortville, France). The pressure of the nebulizer gas (air) was maintained at 3.5 bars and the drift tube temperature was set at 50 °C. The photomultiplier sensitivity was adjusted to gain 7.

2.8.2. Identification, quantification of lipid classes and lipolysis

Identification of lipid classes was carried out by comparison of their retention time with that of pure standards. Calibration curves for TAG, DAG, MAG (Supelco) and FFA (Sigma) were obtained by plotting the peak area vs. the injected amount of serially diluted solutions of standards (0.0125–4 mg). A quadratic fit gave the best correlation factors in the working concentration ranges. The calibrations curves allowed to calculate the wt% of lipid classes in the analysed samples. Bioaccessibility was calculated as the molar proportion of absorbable fatty acids (FFA and fatty acids from MAG) in the total fatty acids present in lipid extracts at a given time of incubation.

2.9. Statistics

Results were reported as mean ± SD based on at least three independent experiments. A multi-way variance analysis (ANOVA) was first performed on the data obtained in gastric or intestine simulated conditions to test the effect of time of incubation, gastric pH, presence of pepsin and possibly measurement conditions (with or without SDS for SLS measurements) ($p < 0.05$, otherwise stated) and their interactions. This analysis allowed to classify the factors as given by F values. Then two-way ANOVAs were performed separately for each time of incubation to highlight the effect of gastric pH and presence of pepsin and their interactions. Finally, one-way variance analysis (ANOVA), followed by a post-hoc multiple range Newman–Keuls test at 0.05 threshold was performed to determine which conditions gave significant different result from the others. Homogeneity of variance was also checked. When this condition was not fulfilled, non-parametric test was performed (Kruskal–Wallis) followed by the post-hoc test and graphical analysis (boxplot). The statistical analyses were performed with Statgraphics Plus 5.1 software (StatPoint Technologies, Warrenton, USA).

3 Results and discussion

3.1. Characterization of the native emulsion

The freshly prepared emulsion contained 1.2 g L^{-1} of BSA and an oil mass fraction of 0.1. The pH of the emulsion was 6.4. It exhibited monomodal droplet size distribution and an average droplet diameter ($d_{4,3}$) of 1.74 µm (Fig. 1). After dilution with SDS the droplet size distribution was very similar with a mean diameter of 1.65 mm, indicating that the native emulsion was not flocculated. The specific surface area was 4.21 ± 0.13 m^2 g^{-1} oil. A representative microphotograph is shown on Fig. 1. Around 0.4 mg mL^{-1} BSA remained in the continuous phase of the native emulsion. This corresponded to 32% of non-adsorbed BSA meaning that the protein was mainly located at the interface, in agreement with a previous study. [44]

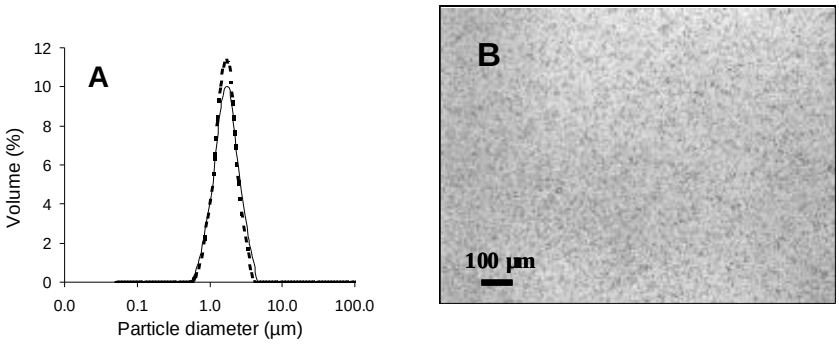


Fig. 1 Droplet size distribution (A) and microscopic pictures (B) of the BSA-stabilized emulsion.

3.2. Behaviour of the emulsion in gastric conditions

Immediately after the addition of the simulated gastric fluids (SGF) and adjustment of the pH to 2.5 or 4.0, the diameter of the droplets increased sharply whatever the gastric conditions (Table 2A; T = 0 hours) to reach an apparent diameter (measured without SDS) ranging from 5.4 up to 40 µm. The droplet size distribution remained however monomodal.

Table 2 Mean volume diameter $d_{4,3}$ (µm) of the oil-water emulsion in different simulated gastric conditions. Measurement were achieved without SDS (A) and with SDS (B) (n=3)[a]

	T=0 hour		T=1 hour	
A	P (K-W) = 0.0156		P (K-W) = 0.13	
Pepsin	pH=2.5	pH=4.0	pH=2.5	pH=4.0
-	$14.9^{b} \pm 2.9$	$20.9^{b} \pm 2.3$	$30.9^{a} \pm 2.3$	$56.2^{b} \pm 5.3$
+	$40.0^{c} \pm 8.5$	$5.4^{a} \pm 1.9$	$46.0^{b} \pm 3$	$48.0^{ab} \pm 21$
B	P (K-W)= 0.061		P (K-W) = 0.025	
Pepsin	pH=2.5	pH=4.0	pH=2.5	pH=4.0
-	$1.76^{a} \pm 0.08$	$1.68^{a} \pm 0.06$	$2.20^{a} \pm 0.06$	$1.87^{a} \pm 0.09$
+	$3.40^{a} \pm 0.60$	$1.75^{a} \pm 0.02$	*3.19 ± 0.08* $43^{b} \pm 5$	*2.25 ± 0.75* $53^{b} \pm 32$

[a] Statistics were performed separately for the samples at T=0 and T=1h incubation and with and without SDS. As the condition of homogeneity of variances was not fulfilled, non-parametric Kruskal-Wallis test (K-W) was performed followed by post-hoc Newman - Keuls test. Within these groups the mean values superscripted by different letters were different at p= 0.05 threshold. Italics correspond to the mean droplet size of a second minor population remaining in the samples.

The distributions of individual droplets were analyzed after dilution of the media with SDS (Table 2B). Immediately after the addition of the SGF, the mean volume diameter of the emulsion was significantly lower than the one measured without SDS. It was close to that measured on the native emulsion. These results proved that this initial increase of the mean diameter upon the addition of SGF can be attributed to flocculation of the droplets. After 1 hour of incubation, the picture drastically changed. Evolution of the mean diameters depended mainly on the absence or presence of pepsin in the SGF. A pronounced increase of the apparent droplet size was observed (Table 2A). The mean diameter ranged from 31 to 56 µm and was significantly lower (31 µm) when the emulsion was incubated at pH 2.5 without pepsin. It was around 56 µm at pH 4.0 (Table 2A). This large increase of the particle diameter can be attributed principally to droplet flocculation as the mean diameter measured after dilution with SDS was close to that of the initial emulsion (Table 2B). In the presence of pepsin, a large portion of the droplets has undergone coalescence as the mean diameter of the main population measured after dilution with SDS was sharply higher (up to 53 µm). It must

be underlined that the pH of the simulated gastric fluid had no significant effect on the fate of the lipid droplets. This was confirmed by the pictures of the emulsion in the various gastric conditions (Fig. 2)

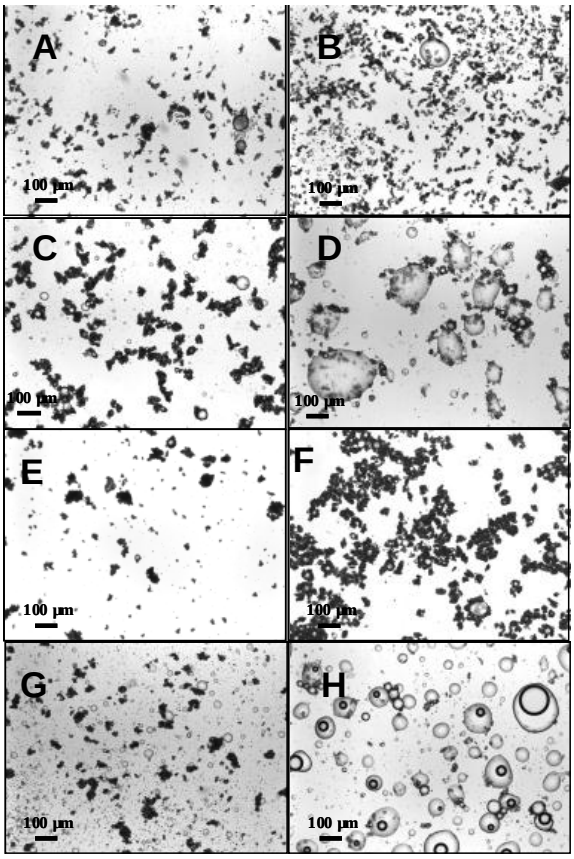


Fig. 2 Influence of simulated gastric conditions on the microstructure of the BSA-stabilized emulsions. Pictures were taken with 10x magnification. Left column: before incubation, right column: 1 hour incubation. (A) and (B): without pepsin pH 2.5, (C) and (D) with pepsin pH 2.5, (E) and (F): without pepsin pH 4.0, (G) and (H) with pepsin pH 4.0.

The occurrence of flocculation of protein-stabilized emulsions under gastric conditions has been already reported. [4,24,34,45–48] Flocculation is induced by the ionic strength of the SGF, and perhaps by the presence of mucin. [24] Hydrolysis of the interfacial proteins by pepsin during the gastric phase weakened the inter- facial film and contributed to droplet coalescence as well. This hydrolysis has been confirmed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of gastric media, which showed the early disappearance of the BSA band during incubation (data not shown). Evolution of the droplet distribution modified the specific surface area (Table 3). In this way, whatever the pH, the specific surface area of the emulsion incubated with pepsin was significantly lower than the one observed without pepsin. This is probably related to the partial coalescence of the droplets upon the hydrolysis of the interfacial proteins. These data obtained by particle size analysis were confirmed by observations made by light microscopy (Fig. 2). Fig. 2D and 2H revealed the presence of coalesced droplets for emulsions being incubated during 1 hour with pepsin. Other pictures highlighted the flocculation of the droplets.

After 1 hour of incubation, modifications of the specific surface areas were limited for emulsions incubated at pH 2.5 or 4.0 without pepsin (4.22 or 3.62 instead of 4.34 m^2 g^{-1} in the initial emulsion), while they were decreased to 1.5 and 0.4 m^2 g^{-1} for emulsions incubated with pepsin respectively for pH 2.5 and 4.0. As lipolysis is an interfacial process, these modifications of the specific surface area in gastric conditions can further modify the adsorption of pancreatic lipases and colipase during the intestinal step of the digestion. [8,49,50].

Table 3 Specific surface area (m^2 g^{-1}) of the emulsified lipids in gastric media just after addition of simulated gastric juice (0 h) or after one hour at 37 °C. The samples were diluted with filtered water (A) or with SDS solution (B)[a]

	T = 0 h		T = 1 hour	
A	P (K-W) = 0.05		P (K-W) = 0.0216	
Pepsin	pH = 2.5	pH = 4.0	pH = 2.5	pH = 4.0
-	1.50 ± 0.12	1.43 ± 0.05	1.41^b ± 0.02	1.14^b ± 0.06
	1.25 ± 0.09	1.93 ± 0.63	0.70^a ± 0.07	0.52^a ± 0.27
B	P (anova) = 0.0000		P (anova) = 0.0000	
Pepsin	pH = 2.5	pH = 4.0	pH = 2.5	pH = 4.0
-	4.33^b ± 0.20	4.49^b ± 0.13	3.62^c ± 0.07	4.22^d ± 0.11
+	3.19^a ± 0.12	4.19^b ± 0.14	1.50^b ± 0.15	0.40^a ± 0.28

[a] Statistics were performed separately for the samples in gastric conditions at T = 0 and T = 1 h incubation and with or without SDS, but the value obtained in the initial emulsion was included. When the condition of homogeneity of variances was not fulfilled, non parametric Kruskal–Wallis test was performed followed post hoc Newman–Keuls test and boxplot to graphically determine the mean values that were different from others. Within the groups the mean value superscripted by different letters were different at the threshold given by these tests.

To summarize, pH had a limited impact on the stability of the emulsion, while the presence of pepsin mainly impacted the fate of the lipid droplet during the gastric phase of digestion.

3.3. Subsequent evolution of the emulsion during the intestinal step

Just after the addition of the simulated intestinal fluid (SIF), the particle diameter evaluated without SDS tended to be reduced when the emulsion had previously been incubated with the gastric medium without pepsin. In contrast, the emulsions previously incubated in the presence of pepsin, disclosed multi-modal populations containing droplets ranging from 1 µm or to 50–100 µm, indicating a drastic modification of the structures (ESI†). In the presence of SDS, the droplet size distribution of the emulsion that had been digested in gastric conditions without pepsin, exhibited two peaks: one below 1 µm and the other one cantered around 2.5 µm, whatever the gastric pH. This suggested fast action of the constituents of the SIF on the structural organization of the emulsion. Conversely, the droplet size distribution of the emulsion being incubated with pepsin during the gastric phase exhibited a broad monomodal peak around to 1 µm (Fig. 3).

During incubation, a drastic reduction of the particle size was observed. Smaller structures than those observed in the initial emulsion or during the gastric step were observed, whatever these previous gastric conditions. Differences in the droplet size distribution as a function of the previous gastric conditions vanished progressively with incubation time in intestinal conditions (Fig. 3). SLS is not appropriate to evaluate particle size below 200–100 nm and complementary analyses have been performed by DLS on the micellar fractions separated from the intestinal media after various times of incubation (results not shown). The analysis revealed the presence of small particles characterized by hydrodynamic diameters ranging from 100 to 250 nm. In fact, measured hydrodynamic diameters varied highly from one analysis to another. Several phenomena could explain the observed variations, firstly the eventual initial dilution of the micellar fraction before the DLS measurement, secondly the dynamic of micelles or vesicle structures that could be impacted by environmental conditions such as temperature, ionic strength and concentration. [51–53]

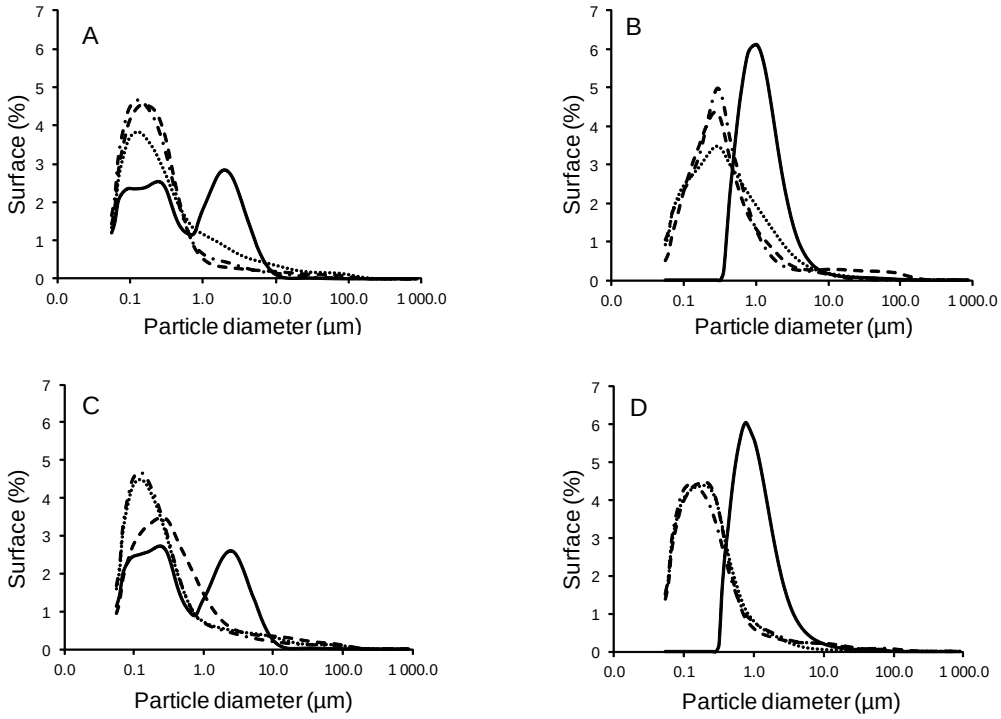


Fig. 3 Static light scattering (SLS) typical particle size distribution of gastric media incubated 0 h (—), 2 h (····), 5 h (-·-·-) or 20h (----) in intestinal-simulated conditions (pH 6.5; 37 °C) after a preliminary step in different gastric conditions: (A) without pepsin, pH 2.5, (B) with pepsin, pH 2.5; (C) without pepsin, pH 4.0, (D) with pepsin, pH 4.0. The samples were diluted in 1% SDS solution before measurement (n = 3).

The evaluation of particle size by SLS and DSL techniques underlined the concomitant presence of lipid droplets and mixed micelles or vesicles during the intestinal step of digestion, these last structures becoming prevalent from 2 hours in intestinal conditions whatever the previous gastric conditions. Consequently, the organization of the droplets at the end of the gastric phase could only affect the early phase of intestinal digestion. Differences shaded off with incubation time.

3.4. Extent of lipolysis

The oil–water surface area in the emulsion condition the access of lipolytic enzymes and their cofactors to the oil phase during the intestinal step of digestion and consequently modify either the kinetics or the extent of lipolysis. [1,8,49,54] The presence of low amounts of FFA and monoacylglycerols (MAG) immediately after the addition of the SIF revealed the lack of lag phase in hydrolysis. Throughout the intestinal digestion no significant difference in lipolysis

was observed as related to the pH (2.5 or 4.0) during the gastric step. As our SGF did not contain lipolytic enzyme, this result will have to be confirmed in the presence of a lipase, whose activity can be greatly affected by pH. After 2 hours of incubation, a significantly higher release of FFA and MAG was noticed in the case of emulsions that have been incubated without pepsin during the gastric step (Fig. 4). This significant effect was observed after 2 and 5 hours of incubation, but was no more effective after 20 hours. Samples being incubated with pepsin in the SGF reached the same proportions of absorbable lipids, namely close to 60%. The lower release of absorbable lipids during the early stage of the digestion in samples previously incubated with pepsin could be due to the lower interfacial area of the lipid droplets, [18,19] to the possible hindrance of the adsorption of lipase and colipase at the interface by hydrolyzed BSA, or displacement by bile salts.

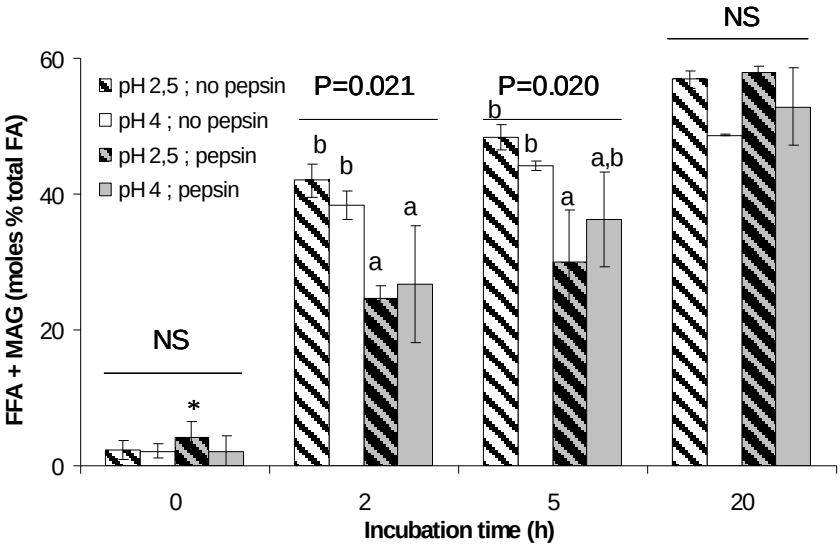


Fig. 4 Evolution of absorbable fatty acids (molar percentage of FFA plus MAG) during incubation of the SAB-stabilized emulsion in intestinal-simulated conditions after a gastric phase performed without pepsin (white) or with pepsin (grey) at pH 2.5 (hatched) or 4.0 (plain). Means and standard deviations of triplicates except for *: n = 2. For an incubation time, different letters indicate significantly different amounts of absorbable lipids (Kruskal–Wallis test, $p < 0.05$ followed by Newman–Keuls test).

Our results highlight that if the gastric conditions can modify the kinetics of lipolysis, they have a limited impact on the final extent of lipolysis after the intestinal step of digestion.

Some studies have focused on the relationship between the composition of the oil–water interface in the emulsions and the rate of lipid digestion. [55–57] If the nature of emulsifier absorbed at the interface can modify the extent of lipolysis, no marked differences have been

highlighted between the lipolysis extent of lipid droplets stabilized by dairy proteins. [57] The overall complexities of lipid digestion phenomena have been recently advanced to explain the weak impact of the initial charge and composition of protein layers on the extent of lipolysis. [36] The composition of the SIF impact more deeply the extent of lipolysis. [47]

4. Conclusions

BSA-stabilized emulsions underwent droplet flocculation with some coalescence depending on the simulated gastric conditions. The pH during the gastric digestion (2.5 or 4.0) had a limited impact on the supramolecular fate of the oil phase. In contrast, pepsin favoured flocculation, and later the coalescence of the droplets probably because it induced hydrolysis of the interfacial protein. These modifications in the structure of the lipid phase under gastric conditions modulated the early stage of lipolysis but did not significantly affect its final extent.

Acknowledgments

This work was supported by INRA and Région Pays de la Loire: Ph-D grant of H.B.K.-D., and of ANR (French National Research Agency) – program ‘‘Alimentation et industries alimentaires–Food and food industry’’: ANR-08-ALIA-002 AGEcaninox project. Authors gratefully acknowledge Martine Armand, Frank Boury and Marie-Caroline Michalski, members of PhD steering committee of H.B.K.-D. for their kind advice.
AM and CG are participants in the FA1005 COST Action INFOGEST on food digestion.

References

1 M. Armand, Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care, 2007, 10, 156–164.

2 H. Poudyal, S. K. Panchal, V. Diwan and L. Brown, Prog. Lipid Res., 2011, 50, 372–387.

3 P. C. Calder, Proc. Nutr. Soc., 2008, 67, 409–418, DOI: 10.1017/s0029665108008690.

4 M. Golding, T. J. Wooster, L. Day, M. Xu, L. Lundin, J. Keogh and P. Clifton, Soft Matter, 2011, 7, 3513–3523.

5 D. Lairon, in Designing Functional Foods. Measuring and Controlling Food Structure Breakdown and Nutrient Absoprtion, ed. D. J. McClements and E. A. Decker, Woodhead Publishing, Oxford, 2009, pp. 68–93.

6 I. Garaiova, I. A. Gushina, S. F. Plummer, J. Tang, D. Wang and N. T. Plummer, Nutr. J., 2007, 6, DOI: 10.1186/1475-2891-6-4.

7 P. Borel, P. Grolier, M. Armand, A. Partier, H. Lafont, D. Lairon and V. Azais-Braesco, J. Lipid Res., 1996, 37, 250–261.

8 G. Favé, T. C. Coste and M. Armand, Cell.Mol. Biol., 2004, 50, 815–831.

9 M. Golding and T. J. Wooster, Curr. Opin. Colloid Interface Sci., 2010, 15, 90–101.

10 D. J. McClements, E. A. Decker and Y. Park, Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 2009, 49, 48–67.

11 P. Reis, K. Holmberg, H. Watzke, M. E. Leser and R. Miller, Adv. Colloid Interface Sci., 2009, 147–148, 237–250, DOI: 10.1016/j.cis.2008.06.001.

12 H. Singh, A. Ye and D. Horne, Prog. Lipid Res., 2009, 48, 92–100.

13 J. C. Bakala N'Goma, S. Amara, K. Dridi, V. KJannin and F. Carrière, Ther. Delivery, 2012, 3, 105–124.

14 M. Armand, P. Borel, B. Pasquier, C. Dubois, M. Senft, M. Andre, J. Peyrot, J. Salducci and D. Lairon, Am. J. Physiol.: Gastrointest. Liver Physiol., 1996, 271, G172–G183.

15 M. Armand, B. Pasquier, M. Andre, P. Borel, M. Senft, J. Peyrot, J. Salducci, H. Portugal, V. Jaussan and D. Lairon, Am. J. Clin. Nutr., 1999, 70, 1096–1106.

16 S. J. Iverson, C. L. Kirk, M. Hamosh and J. Newsome, Biochim. Biophys. Acta, 1991, 1083, 109–119.

17 A. Voho, J. Chen, M. Kumar, M. Rao and J. Wetmur, Epidemiology, 2006, 17, S336, DOI: 10.1097/00001648-200611001-00889.

18 G. Benzonana and P. Desnuelle, Biochim. Biophys. Acta, 1965, 105, 121–136.

19 L. Sarda and P. Desnuelle, Biochim. Biophys. Acta, 1958, 30, 513–521, DOI: 10.1016/0006-3002(58)90097-0.

20 M. C. Carey, D.M. Small and C.M. Bliss, Annu. Rev. Physiol., 1983, 45, 651–677, DOI: 10.1146/annurev.ph.45.030183.003251.

21 B. K. Nordskog, C. T. Phan, D. F. Nutting and P. Tso, Adv. Drug Delivery Rev., 2001, 50, 21–44, DOI: 10.1016/s0169-409x(01)00147-8.

22 O. Hernell, J. E. Staggers and M. C. Carey, Biochemistry, 1990, 29, 2041–2056, DOI: 10.1021/bi00460a012.

23 M. Beysseriat, E. A. Decker and D. J. McClements, Food Hydrocolloids, 2006, 20, 800–809.

24 A. Sarkar, K. K. T. Goh and H. Singh, Food Hydrocolloids, 2010, 24, 534–541, DOI: 10.1016/j.foodhyd.2009.12.005.

25 T. Tokle and D. J. McClements, Food Hydrocolloids, 2011, 25, 976–982, DOI: 10.1016/j.foodhyd.2010.09.012.

26 K. Demetriades, J. N. Coupland and D. J. McClements, J. Food Sci., 1997, 62, 342–347, DOI: 10.1111/j.1365-2621.1997.tb03997.x.

27 A. Lindahl, A. L. Ungell, L.Knutson andH. Lennernas, Pharm. Res., 1997, 14, 497–502, DOI: 10.1023/a:1012107801889.

28 J. B. Dressman, R. R. Berardi, L. C. Dermentzoglou, T. L. Russell, S. P. Schmaltz, J. L. Barnett and K. M. Jarvenpaa, Pharm. Res., 1990, 7, 756–761.

29 R. Schipper, A. Loof, J. de Groot, L. Harthoorn, E. Dransfield and W. van Heerde, J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci., 2007, 847, 45–53, DOI: 10.1016/j.jchromb.2006.10.005.

30 M. H. Vingerhoeds, T. B. J. Blijdenstein, F. D. Zoet and G. A. van Aken, Food Hydrocolloids, 2005, 19, 915–922.

31 W. Y. Huang and J. Tang, J. Biol. Chem., 1969, 244, 1085–1091.

32 M. Schlamowitz and L. U. Peterson, J. Biol. Chem., 1959, 234, 3137–3145.

33 D. W. Piper and B. H. Fenton, Gut, 1965, 6, 506–508, DOI: 10.1136/gut.6.5.506.

34 A. Sarkar, K. K. T. Goth, R. P. Singh and H. Singh, Food Hydrocolloids, 2009, 23, 1563–1569.

35 H. Singh, Food Hydrocolloids, 2011, 25, 1938–1944, DOI: 10.1016/j.foodhyd.2011.02.022.

36 H. Singh and A. Sarkar, Adv. Colloid Interface Sci., 2011, 165, 47–57, DOI: 10.1016/j.cis.2011.02.001.

37 D. J. McClements and E. A. Decker, in Designing Functional Foods. Measuring and Controlling Food Structure Breakdown and Nutrient Absorption, ed. D. J. McClements and E. A. Decker, Woodhead Publishing, Oxford, 2009, pp. 502–546.

38 C. Berton, C. Genot and M. H. Ropers, J. Colloid Interface Sci., 2011, 354, 739–748, DOI: 10.1016/j.jcis.2010.11.055.

39 M. A. Markwell, S. M. Hass, L. L. Bieder and A. E. Tolbert, Anal. Biochem., 1978, 87, 206–210.

40 D. A. Garrett, M. L. Failla and R. J. Sarama, J. Agric. Food Chem., 1999, 47, 4301–4309, DOI: 10.1021/jf9903298.

41 M. C. Herrero-Barbudo, F. Granado-Lorencio, I. Blanco-Navarro, B. Perz-Sacristan and B. Olmedilla-Alonso, Int. Dairy J., 2009, 19, 64–67.

42 M. C. Michalski, F. Michel and C. Geneste, Lait, 2002, 82, 193–208.

43 E. G. Bligh and W. J. Dyer, Can. J. Biochem. Physiol., 1959, 37, 911–917.

44 C. Berton, M. H. Ropers, M. Viau and C. Genot, J. Agric. Food Chem., 2011, 59, 5052–5061, DOI: 10.1021/jf200086n.

45 J. Li, A. Ye, S. J. Lee and H. Singh, Food Funct., 2012, 3, 320–326.

46 A. Malaki Nik, M. Corredig and A.Wright, Food Dig., 2010, 1, 14–27.

47 A. Malaki Nik, A. J. Wright and M. Corredig, Colloids Surf., B, 2011, 83, 321–330, DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.12.001.

48 A. Sarkar, K. K. T. Goth, R. P. Singh and H. Singh, Food Hydrocolloids, 2009, 23, 1270–1278.

49 M. Armand, B. Pasquier, P. Borel, M. Andre, M. Senft, J. Peyrot, J. Salducci and D. Lairon, Ol., Corps Gras, Lipides, 1997, 4, 178–185.

50 F. Carrière, J. A. Barrowman, R. Verger and R. Laugier, Gastroenterology, 1993, 105, 876–888.

51 S. U. Egelhaaf and P. Schurtenberger, Phys. Rev. Lett., 1999, 82, 2804–2807, DOI: 10.1103/PhysRevLett.82.2804.

52 P. Lesieur, M. A. Kiselev, L. I. Barsukov and D. Lombardo, J. Appl. Crystallogr., 2000, 33, 623–627, DOI: 10.1107/s0021889899012765.

53 J. Leng, S. U. Egelhaaf and M. E. Cates, Biophys. J., 2003, 85, 1624–1646, DOI: 10.1016/s0006-3495(03)74593-7.

54 F. Carriere, P. Grandval, P. C. Gregory, C. Renou, F. Henniges, S. Sander-Struckmeier and R. Laugier, J. Pancreas, 2005, 6, 206–215.

55 M. Armand, P. Borel, P. Ythier, G. Dutot, C. Melin, M. Senft, H. Lafont and D. Lairon, J. Nutr. Biochem., 1992, 3, 333–341.

56 Y. Gargouri, R. Julien, A. G. Bois, R. Verger and L. Sarda, J. Lipid Res., 1983, 24, 1336–1342.

57 S. Mun, E. Decker and D. McClements, Food Res. Int., 2007, 40, 770–781.

Certains résultats obtenus lors de cette étude n'ont pas été inclus dans l'article et sont présentés ci-dessous.

IV-1-2-2- Hydrolyse des protéines au cours de la phase gastrique

L'une des explications avancées pour expliquer la coalescence des gouttelettes pendant la phase gastrique en présence de pepsine, était l'hydrolyse de la SAB interfaciale. Des électrophorèses ont été réalisées sur des prélèvements dans les différentes conditions gastriques pour évaluer l'hydrolyse des protéines et notamment de la SAB. Les résultats sont présentés par les figures 23 A et B.

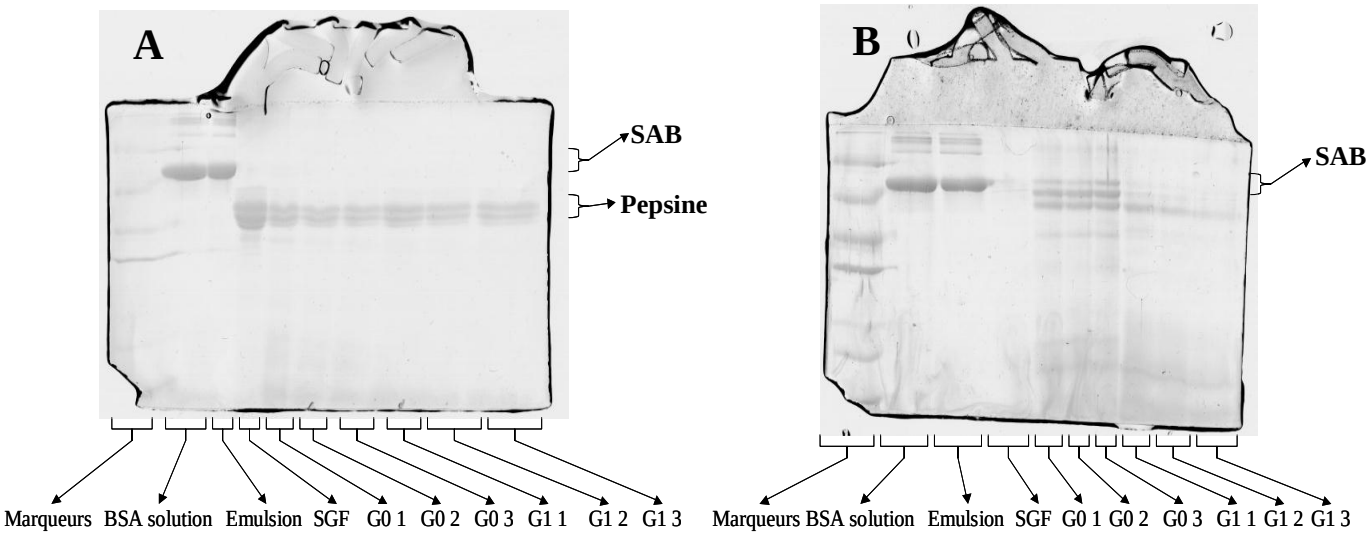


Figure 23: Profils SDS-PAGE de solution native de SAB, de l'émulsion et des milieux gastriques contenant (A) ou pas (B) la pepsine et ce, avant (G0) et après une heure d'incubation (G1).

Le profil SDS-PAGE obtenu pour le SGF contenant la pepsine (Fig. 23 A) montre qu'il n'y a pas de bande de SAB pour les échantillons de milieux gastrique, quel que soit le temps de digestion, suggérant que la SAB présente dans les milieux est rapidement hydrolysée après l'ajout du SGF. En effet, le rapport molaire utilisé dans notre étude entre la SAB et la pepsine est de loin inférieur à ceux couramment utilisés dans les réactions enzymatiques, supposant ainsi une hydrolyse très rapide de toute la SAB dans les milieux. Certains travaux comme ceux de Macierzanka *et al.* montrent que, dans les milieux gastriques, à quantité égale en protéine émulsifiante (1 g L^{-1} de β-cas ou β-lg vs 0,77 g L^{-1} dans la présente étude) et en présence de pepsine 48 fois moins élevé que dans la présente étude, plus de 98% de β-cas dans une émulsion d'huile d'olive dans eau était digérés en 20 min d'incubation (Macierzanka *et al.*, 2009). Dans cette même étude, environ 30% de β-lg

sont digérés dans la première minute. Cependant, les profils « contrôles » obtenus pour les milieux gastriques préparés avec du SGF dépourvu de pepsine (Fig. 23 B) montrent une fine bande de SAB avant l'incubation, bande qui disparaît après une heure d'incubation. La disparition de cette bande anormalement fine sans pepsine suggère que, quel que soit le temps d'incubation, la plupart ou la totalité de la SAB présente dans les milieux gastriques ne pénétre pas dans les pores du gel. Cela peut s'expliquer par la capacité qu'a la mucine de lier la SAB (Stephen *et al.*, 1978), et probablement ses peptides provenant de l'action protéolytique de la pepsine. En effet, en raison de sa taille, la mucine ne peut pas diffuser dans les pores des gels utilisés pour l'électrophorèse permettant de séparer, en terme de poids moléculaire, en même temps la pepsine, la mucine et la SAB. Ainsi, la SAB et ses peptides qui seraient liés à la mucine ne pourraient pas pénétrer dans les gels, et, plus le temps d'incubation est élevé, plus grande serait la quantité de SAB lié à la mucine. Ces résultats montrent que la présence de mucine dans les milieux digestifs rend difficile l'évaluation par électrophorèse de l'hydrolyse de la SAB, même si elle est sans doute digérée par la pepsine directement après ajout du SGF avant l'incubation, dans les milieux gastriques.

IV-1-2-3- Microscopie optique des milieux intestinaux

Des observations en microscopie optique ont été effectuées pour compléter et « valider » les résultats relatifs aux mesures de taille (Fig. 24).

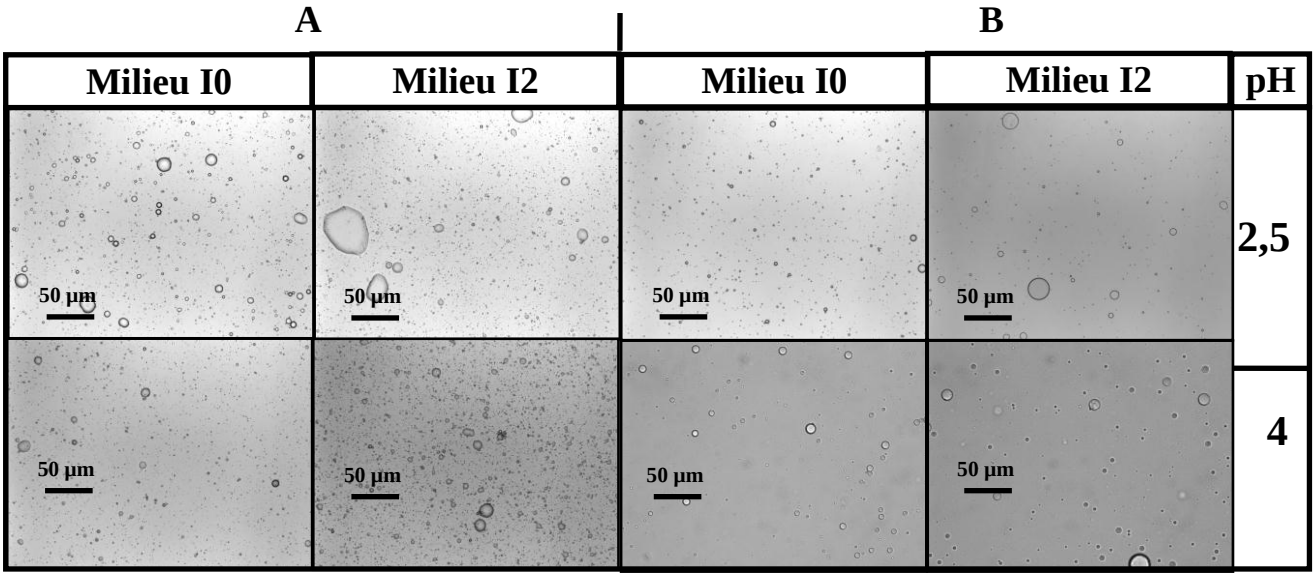


Figure 24 : Photographies sans dilution (A) ou après dilution (B) dans le SDS 1%, des milieux intestinaux avant incubation (I0) ou après 2 heures d'incubation (I2) en fonction du pH des échantillons issus des milieux gastriques contenant la pepsine

La figure 24 montre qu'en fonction des conditions digestives prises en compte, l'organisation des gouttelettes lipidiques dans le système est différente. Cependant, de manière générale, il n'y a pas une très grande différence entre les milieux I0 et I2. La microscopie optique ne permet, en fait, pas d'observer les structures formées au cours de la digestion intestinale (micelles, vésicules, etc.) et susceptibles d'être retrouvées dans les milieux intestinaux. L'observation de ces structures ne peut être effectuée que par des techniques de microscopie électronique permettant de faire des observations de structures de très petites tailles. De plus les structures de grandes tailles qu'on s'attendrait à observer, au regard des profils granulométriques des milieux intestinaux, ne le sont pas du fait de l'instabilité des milieux. En effet, après dépôt des gouttes sur les lames, les gouttelettes lipidiques coalesçaient rapidement et les gouttes formées étaient repoussées sur les bords après dépôt de la lamelle, ce qui rendait impossible leur observation. L'observation de ces structures nécessiterait une étape de préparation qui permettrait d'augmenter la viscosité du milieu et donc de figer les structures avant observation.

IV-1-2-4- Distribution de taille des particules lipidiques présentes dans les phases micellaires

Comme on peut le voir sur la figure 22, après incubation, les profils obtenus pour les milieux intestinaux et exprimés en surface sont tronqués, mettant ainsi en évidence la limite de la technique de diffusion statique de la lumière (SLS) utilisée. En effet, cette technique ne permet pas de caractériser les structures de taille inférieure à 100 nm. Pour caractériser ces structures, après isolation de la phase micellaire (centrifugation 45 min à 5000 g + filtration du surnageant 0,2 µm), l'analyse granulométrique a été faite en utilisant le « nanosizer », instrument permettant de mesurer, par diffusion dynamique de la lumière, des particules de tailles comprises entre quelques nanomètres à plusieurs centaines de nanomètres.

Les figures 25 présentent les profils obtenus pour des essais effectués sur trois jours et sur des échantillons différents.

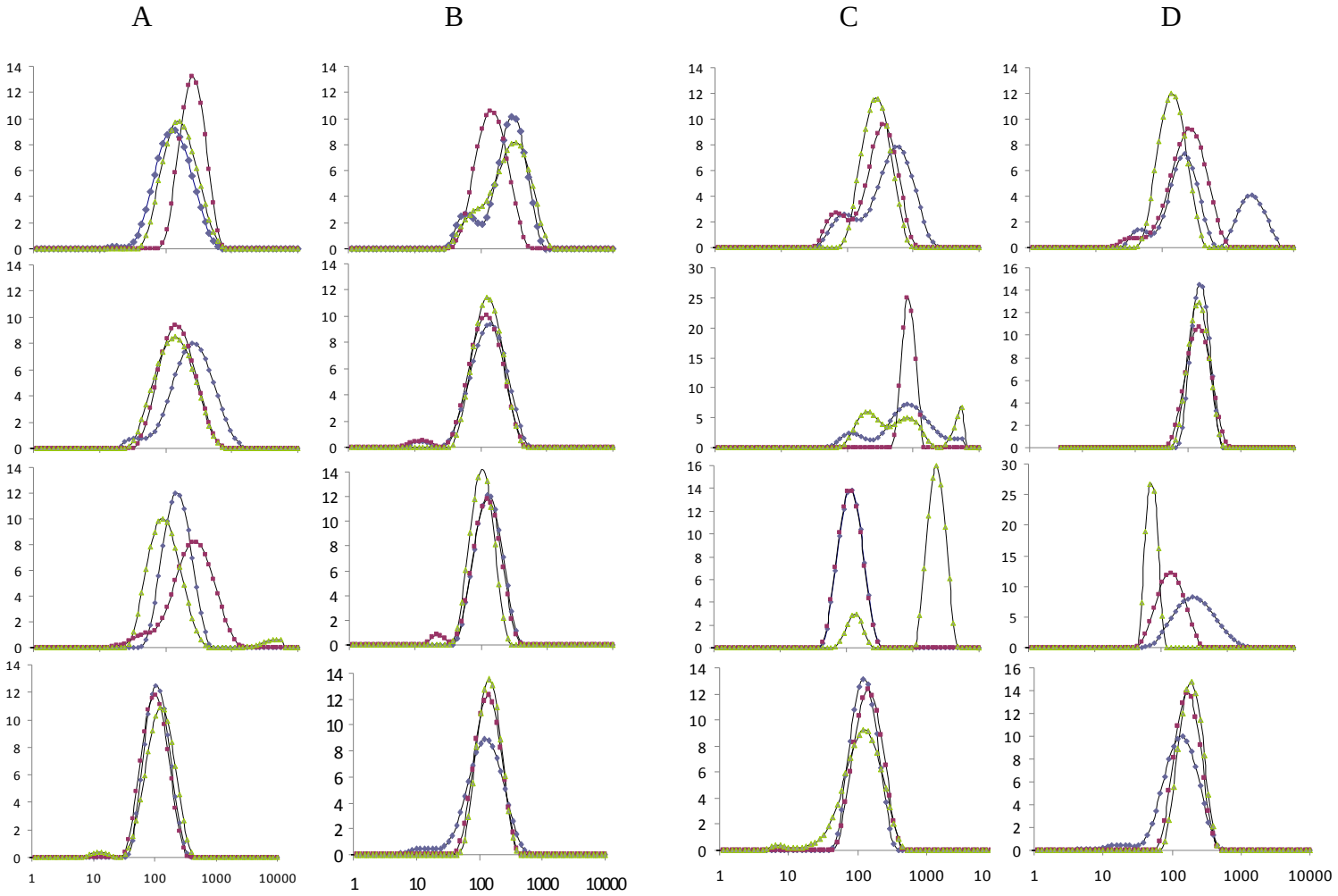


Figure 25 : Distributions en taille des particules dans les fractions micellaires des digesta intestinaux, avant (ligne 1) et après 2 heures (ligne 2), 5 heures (ligne 3) et 20 heures (ligne 4) d'incubation, obtenus après la phase gastrique à pH 2,5 avec (A) et sans pepsine (B) ou à pH 4 avec (C) et sans pepsine (D) (n = 3 digestions indépendantes)

Ces figures soulignent que la répétabilité inter-jour est meilleure pour les échantillons issus des milieux gastriques ajustés à pH 2,5 que ce soit en présence ou en absence de pepsine. Par contre, les mesures réalisées sur les milieux après une phase gastrique à pH 4 sont très peu répétables, exception faite des échantillons collectés après 20 heures de digestion. Ceci pourrait être lié à la complexité du système et notamment à sa composition complexe en composés tensioactifs (AGL, MAG, PL). En effet, les modifications de température, de pH, de force ionique ou de concentration de solutions micellaires induisent des transitions réversibles entre micelles et vésicules (Egelhaaf and Schurtenberger, 1999 ;

Lesieur *et al.*, 2000 ; Leng *et al.*, 2003). De manière générale, les phases micellaires extraites des milieux intestinaux contiennent des particules de diamètre allant de 6 à 1000 nm, dont le diamètre hydrodynamique (Z-Average) est compris entre 100 et 250 nm. Ces résultats, comme ceux obtenus par diffusion statique de la lumière, suggèrent la formation de très petites gouttelettes lipidiques et/ou des structures de solubilisation des lipides digérés. Les tailles (diamètres) de ces structures sont comprises entre 1 et 15 nm pour les micelles et sont de plusieurs dizaines à quelques centaines de nm pour les vésicules (Cohen and Carey, 1990 ; Hernell *et al.*, 1990 ; Fatouros *et al.*, 2009).

La figure ci-dessous présente les évolutions des diamètres hydrodynamiques moyens obtenues pour les phases micellaires en fonction des conditions de digestion gastrique.

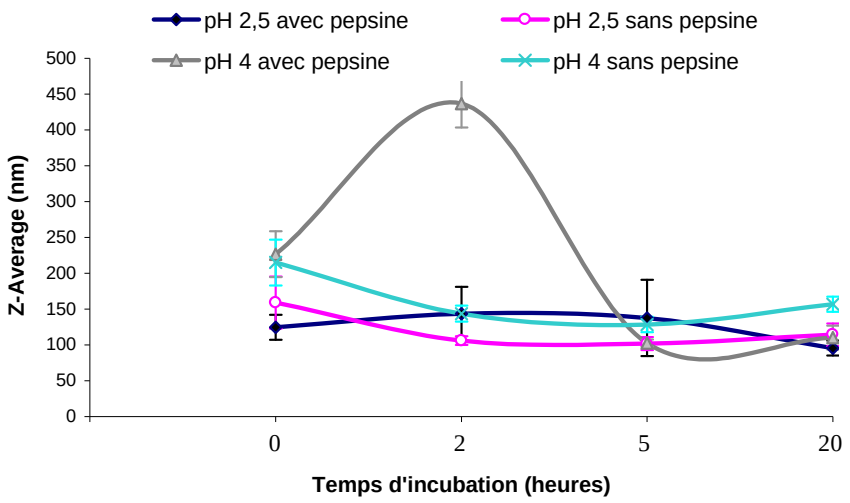


Figure 26 : Évolution du *Z-Average* (diamètre hydrodynamique) des particules présentes dans la phase micellaire au cours de l'incubation (n = 3)

Il se dégage de cette figure deux évolutions en fonction des conditions digestives. En effet, quel que soit le pH, l'absence de pepsine dans le compartiment gastrique conduit au cours de l'incubation intestinale à une diminution du diamètre hydrodynamique entre 2 et 5 heures suivie de son augmentation à 20 heures d'incubation. En présence de pepsine dans les milieux gastriques, on note dans les milieux intestinaux qui en découlent non pas une diminution, mais une augmentation après deux heures d'incubation (très prononcé pour la phase gastrique à pH 4) du diamètre hydrodynamique suivie d'une diminution jusqu'à 20 heures d'incubation. Cette observation confirme celle faite lors de la dilution dans un tampon d'une solution de micelles mixtes de glycocholate/lecithine (Son and Alkan, 1989).

IV-1-3- Évolution au cours de la digestion in vitro de l'émulsion riche en AGPI n-3 LC et stabilisée par les tensioactifs

IV-1-3-1- Évolution des structures colloïdales

L'évolution de la granulométrie de l'émulsion stabilisée par le Tween 80 et la lécithine a également été suivie tout le long de la digestion *in vitro* par DLS et SLS (une digestion uniquement). Au cours de la phase gastrique, aucune modification de la distribution des gouttelettes lipidiques n'a été mise en évidence que ce soit pour les milieux « témoin », sans suc gastrique simulé ou « essai », avec suc gastrique simulé. Les diamètres moyens des particules présentes dans les milieux gastriques vont de 205 nm à 210 nm (diamètre initial de 205 nm). Cette observation confirme celle faite au cours de la digestion gastrique d'émulsions stabilisées par du Tween 80 (Van Aken *et al.*, 2011).

Cette stabilité des émulsions au cours de la phase gastrique des gouttelettes lipidiques pourrait essentiellement être liée à la nature de l'interface des gouttelettes des émulsions. En effet, la pepsine n'a aucun effet connu sur l'hydrolyse des phospholipides présents à l'interface et n'induirait ainsi pas de déstabilisation du film interfacial. La PC est un zwitterion et de ce fait possède une charge nette positive à pH acide comme c'est le cas pour la SAB à des pH inférieurs à 5 (Collins *et al.*, 2002 ; Fologea *et al.*, 2007). A ce pH, les gouttelettes lipidiques qui portent une charge nette positive exercent donc une répulsion réciproque entre elles. Pour ce qui est de la mucine gastrique de porc, des études électrophorétiques ont estimé son pI entre 2 et 3 (Lee *et al.*, 2005). Ainsi, au pH gastrique (2,5), elle possède donc une charge nette nulle et peut donc se rapprocher de l'interface des gouttelettes lipidiques sans subir de répulsion électrostatique. La floculation observée avec l'émulsion stabilisée par la SAB est probablement due à la capacité qu'a la mucine de former des liaisons hydrogène et/ou hydrophobe avec les molécules de SAB adsorbées aux interfaces (Stephen *et al.*, 1978 ; Hassan and Gallo, 1990). L'absence d'évolution de la taille des particules avec l'émulsion stabilisée par les tensioactifs pourrait s'expliquer d'une part par l'incapacité de la mucine à former des liaisons hydrogène ou hydrophobe avec les tensioactifs aux interfaces des gouttelettes et ainsi de créer des liaisons inter-gouttelettes responsables de la floculation et d'autre part par la répulsion électrostatique inter-gouttelettes. En effet des mesures du potentiel zêta des gouttelettes lipidiques dans les milieux gastriques à pH 2,5 ont montré que les gouttelettes portent une charge nette positive (Annexe 1).

En conditions intestinales, les évolutions montrent des tendances différentes (Fig. 27).

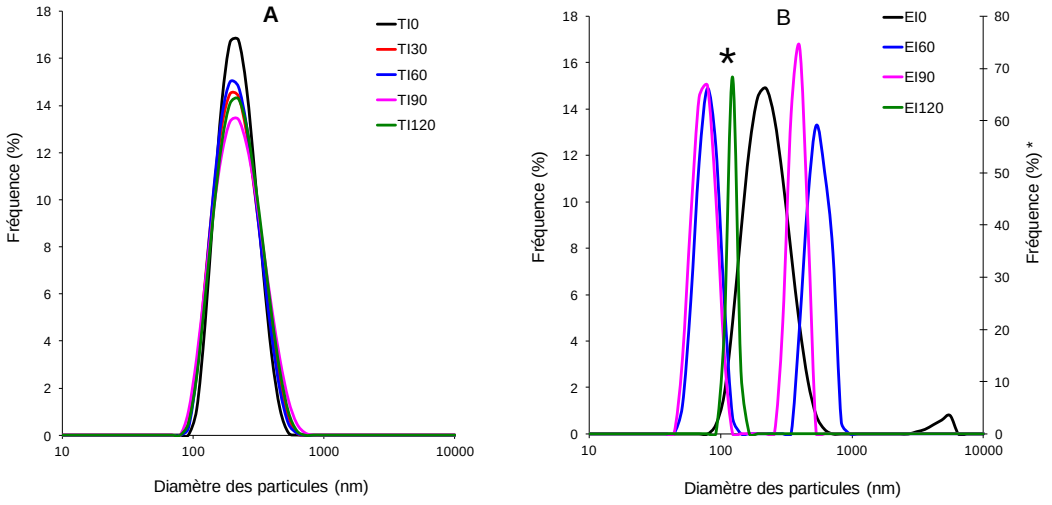


Figure 27 : Profils granulométriques des milieux « témoins » (**A**) et « essais » (**B**) de l'émulsion Tween 80-PC au cours de la phase intestinale (n = 1)

Dans les milieux « témoins », en absence de sucs pancréatico-biliaires, il n'y a pas d'évolution de taille ou d'organisation de l'émulsion AGPI n-3_Tween 80-PC en phase intestinale (figure 27 A). Cependant, dans les milieux « essais » en présence des sucs pancréatico-biliaires simulés, la taille des particules évolue au cours de la phase intestinale. Directement après ajouts des sucs et avant incubation, la distribution des particules est identique à celles observées dans les milieux gastriques. Après 60 et 90 minutes d'incubation, on note la disparition de la distribution monomodale avec apparition de deux nouvelles populations, une de diamètre plus petit et une autre de diamètre plus grand (figure 27 B) que le diamètre des particules en début de phase intestinale. La première population serait issue soit de la digestion des gouttelettes lipidiques initialement présentes qui perdent ainsi en matière après extraction des produits de lipolyse, soit de la formation, avec les sels biliaires, par ces produits d'hydrolyse des structures de transport (micelles mixtes et vésicules) qui permettent leur absorption. La deuxième population quant à elle serait issue de la déstabilisation, vraisemblablement soit par coalescence induite par l'hydrolyse des PL interfaciaux par la phospholipase A_2 présente dans le suc pancréatique simulé, soit par l'adsorption/désorption compétitive des tensioactifs à l'interface. Après 120 minutes d'incubation, une population unique reste présente dans les milieux, population dont le diamètre hydrodynamique est environ le double de celui des particules attribuables aux structures de solubilisation ou de transport. Cette population pourrait correspondre à une agrégation des structures de solubilisation comme c'est le cas pour les micelles secondaires

qui sont des juxtapositions de micelles primaires reliées par des liaisons hydrogènes (Mukhopadhyay and Maitra, 2004).

IV-1-3-2- Évolution de la lipolyse

La taille des gouttelettes lipidiques ainsi que la nature de leur interface peuvent modifier la lipolyse au cours de la digestion. La figure 28 présente l'évolution des classes lipidiques au cours de la digestion *in vitro* de l'émulsion Tween 80-PC.

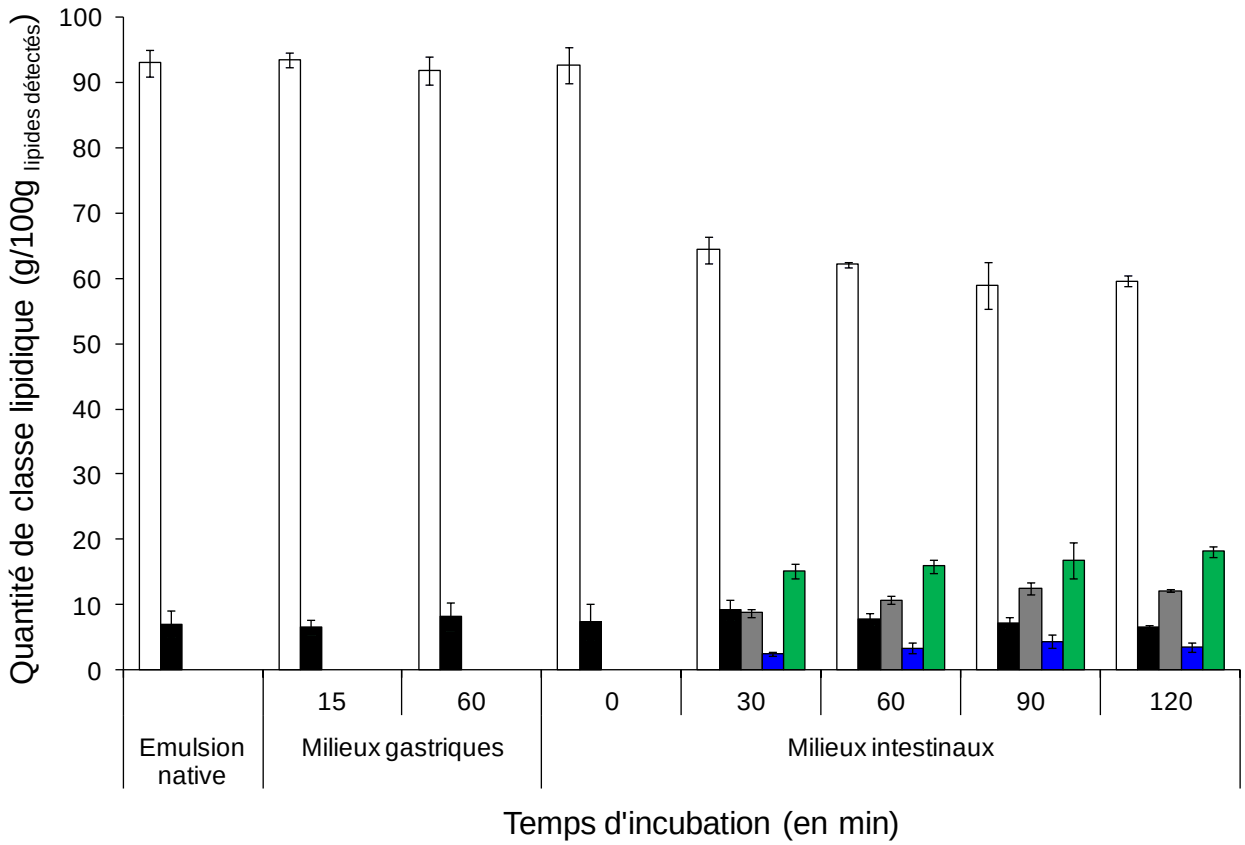


Figure 28 : Évolution du pourcentage massique des triglycérides (bande blanche), phospholipides (barres noire), diglycérides (barres grise), monoglycérides (barres bleu) et acides gras libres (barres verte) au cours de la digestion *in vitro* de l'émulsion Tween 80. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de 3 répétitions de cinétiques.

Les résultats montrent, comme pour l'émulsion stabilisée par la SAB, qu'il n'y a pas de lipolyse pendant la phase gastrique. Après 30 minutes d'incubation intestinale, la quantité de triglycérides a diminué d'un peu plus de 30 % tandis que des quantités importantes de diglycérides, de monoglycérides et d'acides gras libres sont formées. Par la suite, de manière générale, les quantités n'augmentent quasiment pas et restent constantes jusqu'à 120 minutes. La lipolyse se produirait donc essentiellement pendant les 30 premières minutes suivant

l'ajout des sucs pancréatico-biliaires simulés aux milieux gastriques. Bien qu'il soit difficile de comparer directement ces données à celles obtenues sur la cinétique d'hydrolyse des TAG de l'émulsion colza-SAB, il est toutefois possible de constater qu'après 2 heures d'incubation intestinale, les quantités de lipides absorbables sont similaires. En effet, elle est de 21,7 ± 0,8 g $100g^{-1}$ de lipides pour l'émulsion AGPI n-3 Tween80-PC alors que dans les mêmes conditions digestives, elle était de 24,4 ± 2,0 g $100g^{-1}$ de lipides pour l'émulsion colza-SAB. Ces résultats corroborent ceux de Van Aken *et al.* (2011) qui ont montré que le taux de lipolyse ne diffère pas forcément entre des émulsions stabilisées par des protéines ou par du Tween 80 (Van Aken *et al.*, 2011). Cependant, ils vont à l'encontre de ceux retrouvés dans la littérature montrant que plus la taille des gouttelettes lipidiques est petite, plus importante est la lipolyse. De plus, pour cette émulsion comme pour celles stabilisées par la SAB, le taux de lipolyse est inférieur à celui obtenu dans de nombreuses études. Il est cependant important de considérer que dans ces travaux, les méthodes de quantification de la lipolyse étaient différentes et reposaient pour la plupart sur une évaluation au pH-Stat. Toutefois, les quantités d'extraits biliaires utilisés dans notre étude semblent, en comparaison avec des travaux effectués récemment au sein du laboratoire, insuffisantes pour induire une solubilisation complète des produits absorbables de la lipolyse qui induit probablement une inhibition de la lipase par les produits d'hydrolyse. Concernant les phospholipides, de manière étonnante, leur quantité dans les milieux ne diminue pas au cours de la phase intestinale, suggérant ainsi une absence d'hydrolyse des lécithines interfaciales ce qui contredit partiellement l'hypothèse avancée quant à la coalescence de cette émulsion dans le compartiment intestinal. Cette absence d'hydrolyse pourrait être dûe d'une part à l'absence de phospholipases actives dans la pancréatine utilisée et d'autre part à la présence de la phosphatidylcholine dans une conformation inaccessible pour les phospholipases.

IV-2- OXYDATION DES LIPIDES ÉMULSIFIÉS AU COURS DE LA DIGESTION

IV-2-1- Adaptation du protocole digestif pour l'étude de l'oxydation

Au cours de la digestion, après ingestion des aliments qui s'accompagne d'une ingestion d'un certain volume d'air, les échanges gazeux sont limités entre l'intérieur et l'extérieur des compartiments gastrique et intestinal du tractus digestif. Dans un souci de conserver cette caractéristique lors de l'étude de l'oxydation en conditions digestives, phénomène dans lequel la quantité d'oxygène disponible tient un rôle central, le protocole de digestion *in vitro* mis en place a été adapté. Celle-ci a consisté à déterminer les volumes d'émulsion, de suc gastrique, de HCl, de bicarbonate de Na et de sucs pancréatico-biliaires à ajouter successivement dans des tubes *headspace* de 20,5 mL pour constituer les milieux gastriques et intestinaux. Le mode opératoire a été pensé de manière à pouvoir ajouter après la fermeture des tubes, les constituants du milieu intestinal (bicarbonate et sucs pancréatico-biliaires simulées) de façon à conserver l'étanchéieté. Des seringues à gaz étanches en verre munies d'aiguille fine ont été choisies à cet effet. Les volumes d'HCl et de $NaHCO_3$ ne pouvant pas être calculés, ils ont été déterminés expérimentalement. Les tableaux IX et X présentent les volumes de HCl et de $NaHCO_3$ à ajouter aux milieux gastriques avant et après incubation et nécessaire à l'ajustement du pH intestinal après ajout des sucs pancréatico-biliaires pour les émulsions stabilisées par la SAB et les tensioactifs respectivement.

Tableau IX : Volumes de HCl à ajouter aux milieux gastriques avant incubation et de $NaHCO_3$ à ajouter après incubation pour ajuster le pH des milieux digestifs issus d'émulsions stabilisées par la SAB

pH initial	V_{HCl} ajouté (µL)	pH final		pH après incubation	V_{NaHCO_3} ajouté (µL)	pH final
4,7	35,0	2,452		2,521	120	6,570
4,630	35,0	2,324		2,377	100	6,430
4,740	30,0	2,483		2,508	97,5	6,450
4,664	30,0	2,421		2,484	100	6,435
4,616	35,0	2,422		2,282	110	6,336
4,715	35,0	2,512		2,295	100	6,389
4,635	32,5	2,470		2,390	100	**6,535**
4,695	30,0	2,492		2,446	100	**6,498**
4,700	35,0	2,450		2,278	105	**6,494**
4,615	30,0	2,453		2,123	100	**6,502**
4,626	30,0	2,461		2,311	100	**6,524**
4,670	30,0	2,508		2,457	100	**6,558**
4,67 ± 0,04	32,3 ± 2,5	2,45 ± 0,05	Moyenne ± Ecart types	2,37 ± 0,12	101,1 ± 3,4	6,41 ± 0,05 **6,52 ± 0,03***

* Les valeurs en gras ont été obtenues pour un ajustement préalable des sucs pancréatico-biliaires à 6,5

Tableau X : Volumes de HCl à ajouter aux milieux gastriques avant incubation et de $NaHCO_3$ à ajouter après incubation pour ajuster le pH des milieux digestifs issus d'émulsions stabilisées par les tensioactifs (Tween 80/PC)

pH initial	V_{HCl} ajouté (µL)	pH final		pH après incubation	V_{NaHCO_3} ajouté (µL)	pH final
4,38	24	2,511		/	60	6,600
	24	2,504		/	55	6,430
4,404	24	2,499		/	58	6,507
	24	2,518		/	58	6,546
4,20	24	2,375		/	58	6,532
	24	2,518		/	58	6,503
4,33 ± 0,09	24 ± 0	2,49 ± 0,05	Moyenne ± Ecart types	/	57,83 ±1,46	6,52 ± 0,05

Au regard de ces tableaux, les volumes de HCl et de $NaHCO_3$ à utiliser pour les ajustements de pH étaient 32,3 µL et 100 µL pour l'ajustement des pH dans le cas des émulsions stabilisées par la SAB. Par contre, ils étaient de 24 µL et 58 µL pour les émulsions stabilisées par le mélange Twen80-PC. La même méthodologie a été appliquée pour la détermination des volumes de HCl et de $NaHCO_3$ à utiliser pour l'ajustement du pH des milieux « contrôle ».

IV-2-2- Émulsion d'huile de colza stabilisée par la SAB

IV-2-2-1- (Article 3) Effets de la composition des milieux digestifs et des conditions digestives sur l'oxydation des lipides : rôle des sucs digestifs, des tocophérols et d'un initiateur de l'oxydation

Lipid oxidation in food emulsions under gastrointestinal simulated conditions: the key role of endogenous tocopherols and initiator

***Food Digestion* (sous presse)**
Received 8 june 2012, accepted 16 november 2012
DOI : 10.1007/s13228-012-0026-9

H.B. Kenmogne-Domguia, A. Meynier *, C. Boulanger, C. Genot

INRA, UR1268 Biopolymères Interactions Assemblages, BP71627, F-44316 Nantes, France

Lipid oxidation in food emulsions under gastrointestinal simulated conditions: the key role of endogenous tocopherols and initiator

H.B. Kenmogne-Domguia, A. Meynier *, C. Boulanger, C. Genot

INRA, UR1268 Biopolymères Interactions Assemblages, BP71627, F-44316 Nantes, France
anne.meynier@nantes.inra.fr; phone : 33 2 40 67 52 45 ; fax : 33 2 40 67 50 84
Received 8 june 2012, accepted 16 november 2012
DOI : 10.1007/s13228-012-0026-9

Abstract

The health significance of lipid oxidation products carried by the diet or eventually formed during food digestion is actually addressed. Accordingly some data show that the gastric environment could be pro-oxidant. The aim of this work was to evaluate the impact of the balance between lipophilic antioxidant species and dietary prooxidant on lipid oxidation under *in vitro* gastrointestinal conditions. Rapeseed oil-in-water emulsions stabilized by bovine serum albumin were submitted successively to simulated stomach and intestinal conditions. Lipid oxidation was evaluated through the measurement of oxygen consumption, the formation of hydroperoxides (HPX), and malonaldehyde (MDA). With endogenous tocopherols (553 mg kg^{-1} oil) and without initiator (metmyoglobin) no oxygen was consumed, while its presence, at 20µM, induced a weak oxygen consumption and formation of MDA during the gastric (73 ± 13 nmoles g^{-1} lipids) and intestinal steps (163 ± 13 nmoles g^{-1} lipids). Without endogenous tocopherol (< 2 mg kg^{-1} oil) and with metmyoglobin (20 µM), amounts of hydroperoxides and MDA reached 79 ± 28 µmoles g^{-1} lipids and 2139 ± 78 nmoles g^{-1} lipids respectively after the gastric phase and 113 ± 22 µmoles g^{-1} lipids and 2663 ± 38 nmoles g^{-1} lipids after the intestinal phase. The results indicate that the composition of the food bolus, in particular the presence of lipophilic antioxidant and/or prooxidant species, is critical for the oxidative fate of emulsified lipids during digestion. Moreover, the physicochemical conditions of the digestion, rather than the constituents of simulated digestive fluids seem to favor lipid oxidation.

Keywords : oil-in-water emulsion, in vitro digestion, lipid oxidation, tocopherol, hydroperoxides, MDA

Introduction

Over the past 30 years, n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) have been recognized for their potent impact in disease prevention such as cardiovascular diseases. Dietary recommendations are to increase the consumption of n-3 PUFA and to decrease the consumption of n-6 PUFA. Market of dietary supplements and n-3-enriched foods has accordingly dramatically increased since the beginning of the 2000's.

However, n-3 PUFA are highly oxidizable species. Thus one challenge for the food industry is to guarantee the oxidative stability of the enriched-foods during the whole production-to-consumption chain. In fact, it remains actually unresolved whether the chronic consumption of low amounts of lipid oxidation products can or not present health hazards [5,21]. On the one hand, it is generally accepted that rancid or unpleasant smell or taste associated to lipid oxidation prevents the consumption of large amounts of lipid oxidation products by consumers [11]. On the other hand, both primary (hydroperoxides) and secondary products (trans-alkenals) of lipids oxidation can be absorbed in the intestine [4,18,20,29,34]. Accumulating evidences suggest that dietary oxidized lipids can contribute to the pathogenesis of disease such as atherosclerosis [10].

The lipid oxidation products can be either present in the consumed foods or formed throughout the digestive tract. In fact, in the early 2000's Kanner et al postulated that the stomach can act as a bioreactor towards lipid oxidation [16,22]. It was also shown that antioxidants such as phenolic compounds can prevent this reaction [22,24,25]. To evaluate the potential health hazard linked to the consumption of large amount of polyunsaturated lipids, it is therefore of central importance to evaluate the oxidative fate of the unsaturated lipids during digestion.

The aim of this work was to evaluate the impact of endogeneous antioxidants (tocopherols) and initiator of lipid oxidation (metmyoglobin) on the oxidation of a model oil-in-water emulsion under *in vitro* digestive conditions. To achieve this goal, the protein-stabilized model emulsion, already set up in a previous work [23], was prepared with either commercial rapeseed oil as n-3 containing lipid phase or the same oil stripped from its endogeneous tocopherols. The digestion protocol was adapted to avoid the permanent contact of the digestive media with ambient air. A pH equal to 2.5 was chosen for the simulated gastric phase because it corresponds to a mean value of the pH of the gastric medium in the fasted state [2,3,33] and because some studies suggest that an acidic pH favours lipid oxidation [15,22]. Metmyoglobin was chosen as initiator of lipid oxidation because this highly redox-active heme form of dietary iron is present in food bolus after meat consumption. Lipid

oxidation was assessed by three complementary markers namely oxygen consumption, formation of hydroperoxides (HPX) and malonaldehyde (MDA), respectively primary and secondary products of lipid oxidation. Finally, to point out the role of the physico-chemical conditions of the digestion and digestive process itself, including the constituents of the digestive fluids, in the oxidative fate of lipids, control experiments were performed without the simulated gastric and intestinal fluids (SGF and SIF).

Materials and methods

Materials

Rapeseed oil (Lesieur, Fleur de Colza) was purchased from a local supermarket. It contained oleic acid (59 %), linoleic acid (23 %) and α-linolenic acid (11 %) as major fatty acids and 553 ± 7 mg kg^{-1} tocopherols. It was purified on alumina to remove tocopherols [7]. Stripped oil contained less than 2 mg kg^{-1} tocopherols.

Bovine serum albumin (BSA; Cohn Fraction V Powder, 95-98%) was purchased from MP Biomedical. Chemicals reagents and solvents were of analytical grade: potassium chloride (99.5%, Merck), sodium chloride (100%, VWR Prolabo), sodium bicarbonate (99.5% Carlo Erba), hydrochloric acid (37%, Carlo Erba), calcium chloride (97%, Sigma), butylated hydroxytoluene (99%, SAFC), ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (99%, Panreac), trichloroacetic acid (≥99%, Sigma-Aldrich), 1,1,3,3-Tetraethoxypropane (97%, Sigma), 2-Thiobarbituric acid (98%, Sigma), sodium hydroxide (>97%, Carlo Erba), ethyl alcohol (≥99.9%, Carlo Erba), Sodium phosphate monobasic (98-100.5%, Sigma Aldrich), methyl alcohol (≥99.9%, Carlo Erba), acetonitrile (>99.9%, Biosolve BV), propan-2-ol (≥99.9%, Carlo Erba), ferrous ammonium sulfate (>99%, Fluka), xylenol orange tetrasodium salt (Fluka), hydrogen peroxide (30%, Fluka), sulfuric acid (96%, Carlo Erba), alumina (N-super I, MP Biomedicals), mucin (type 2 from porcine stomach), pepsin (from porcine gastric mucosa, 2500-3500 units mg^{-1} protein), metmyoglobin (from equine skeletal muscle), pancreatin (porcine pancreas, 8xUSP specification), lipase (type II, crude from porcine pancreas), and bile extract (porcine) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Company (Saint-Quentin Fallavier, France). The bile extract contained 1-5% hyodeoxycholic acid, 0.5-7% deoxycholic acid, 0.5-2% cholic acid, 10-15% glycodeoxycholic acid and 3-9% taurodeoxycholic acid as stated by the supplier.

Emulsion preparation

Oil-in-water emulsions, stabilized by BSA, previously solubilized in a saline solution (120 mM NaCl, 6 mM $CaCl_2$, 5 mM KCl), were prepared with the commercial and the purified rapeseed oils as the oily phase to a final oily mass fraction of 0.1 as described in [23]. They were characterized by narrow monomodal distributions and mean droplet sizes of 1.74 ± 0.03 µm.

In vitro digestion model

To simulate gastric and intestinal phases, we used an *in vitro* model of digestion based on previous works related to the bioaccessibility of lipophilic compounds [14,19]. The compositions of the simulated digestive fluids are detailed in [23] with the modifications required by the conditions to measure lipid oxidation. The emulsion (3.36 mL) and the simulated gastric fluid (SGF, 1.89 mL, containing 2.7 g L^{-1} mucin and 6.7 g L^{-1} pepsin) were added into 20.5 mL headspace vials. The pH was adjusted to 2.5 by the addition of a predefined volume of 1M HCl (32.2 µL). When required, metmyoglobin solution (20 µM in the gastric media) was added before pH adjustment. The vials were sealed with Teflon/silicon septa and aluminium caps and then incubated in the dark for 1 h at 37 °C under magnetic stirring (400 rpm). To simulate the intestinal step of the digestion, the pH of the medium was adjusted to 6.5 by adding 100 µL of 1 M $NaHCO_3$ before the sequential addition of 1.26 mL of reconstituted bile extract and 3.5 mL of simulated intestinal juice (SIF, containing 1.12 g L^{-1} pancreatin and 0.56 g L^{-1} pancreatic lipase) whose pH had been previously adjusted to 6.5. These additions were performed with syringes through the septum. The vials were further incubated at 37 °C under magnetic stirring (400 rpm) for 2 hours. O_2 consumption was measured in the headspace of the tubes before sampling for measurement of the others markers of lipid oxidation. For MDA measurement, samples of the incubated media were deposited in tubes containing 40 µL of a solution of butylated hydroxytoluene (BHT) in ethanol (1 µg $µL^{-1}$). All samples were rapidly frozen and stored at -80°C until the analysis.

To assess the role of the constituents of the digestive fluids in lipid oxidation, control tubes were prepared by replacing SGF and SIF by the equivalent volumes of saline solution.

Accelerated oxidation of the rapeseed oil

The stripped rapeseed oil was submitted to accelerated oxidation conditions to compare the amounts of lipid oxidation products formed with those found in the digestive conditions. Briefly, 500 mg of oil were introduced in 20.5 mL headspace tubes sealed thereafter with Teflon/silicon septa and aluminum caps. The tubes were incubated for 11 days in the dark at

37 °C. Individual tubes were used for evaluation of lipid oxidation at different times of incubation (O_2 consumption, hydroperoxides, MDA).

Assessment of lipid oxidation

O_2 consumption

O_2 concentration in the headspace of the samples was measured by gas chromatography with the method previously described [8,36]. The results were means of three measurements for three digestions and expressed in µmoles of consumed O_2 per g of oil (µmol O_2 g^{-1}oil).

Hydroperoxides

Hydroperoxides were directly quantified in the emulsions and in the digestive media by a modified ferrous-xylenol orange (FOX) assay which avoids the lipid extraction step [13,27]. Depending on their level of oxidation, the samples were diluted 28 to 135 times in isopropanol and finally 10 times in FOX reagent (that contained 2 mM BHT). The standard curve (0-15 µM) was done with solutions of hydrogen peroxide (30% H_2O_2, Fluka) in isopropanol. Results were means of two measurements performed during three independent digestions unless specified and were expressed in µmoles eq H_2O_2 g^{-1} lipids.

Quantification of malonaldehyde (MDA)

MDA is a secondary product of lipid oxidation arising from the decomposition of hydroperoxides of polyunsaturated fatty acids. It was quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC) paired with a fluorescence detector after being extracted by trichloro-acetic acid (TCA) and reacted with thiobarbituric acid (TBA) [6,17,26,28]. Briefly, on the day of analysis the 100-200 µL aliquots of the digestive media sampled with BHT were rapidly thawed and 80 µL ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 0.1 M and 10 mL of TCA 0.3 M were added. After one minute of agitation (3000 rpm), and 5 minutes sonication in an ice bath, 3 mL of the lower phase, was taken and allowed to react with 3 mL of TBA (55.5 mM) for 20 min at 70°C. The samples were then cooled. Twenty (20) µL of the reaction mixtures were injected on a u-HPLC system paired with a C18 column (Symetry, 150 mm* 4.6 mm, 5µm), and a fluorimeter (λ ex: 535 nm, λ em: 555 nm). The MDA-$(TBA)_2$ complex was eluted at 1 ml. min^{-1} with a mobile phase composed of NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 buffer (50 mM, pH 6.8)/methanol/acetonitrile (72/17/11; v/v/v). A standard solution of MDA was prepared by acid hydrolysis of 1,1,3,3- tetra-ethoxy-propane (TEP) for 5 min in a boiling water bath. The exact concentration of MDA in the standard solution was determined from its absorbance at 245 nm using a ε of 13 700 L mol^{-1} cm^{-1} [6,12]. The calibration curve ranged

from 12.5 nM to 7.5 µM. Results were expressed in nmoles MDA g^{-1} lipids using the standard curve.

Results and discussion

In postprandial state, when food bolus and saliva are swallowed, the digestive tract can be considered as a closed space containing limited amount of air without gas exchange with the external environment. In such environment, the quantification of oxygen consumption during the *in vitro* digestion is a valuable and rapid tool. Figure 1 shows the effect of the emulsion composition on O_2 consumption.

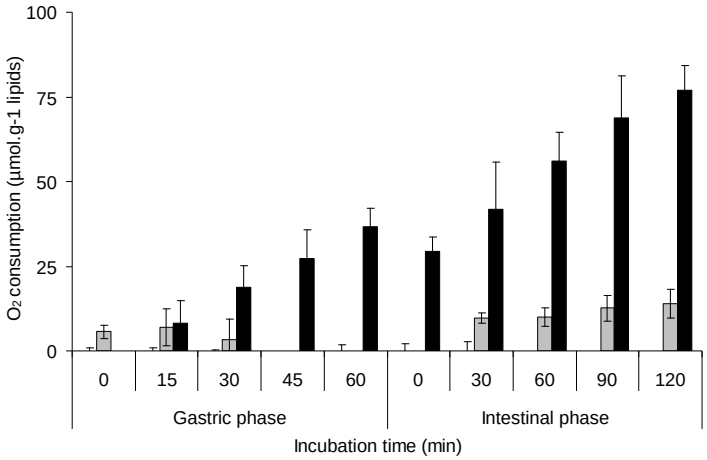


Figure 1. Oxygen consumption during *in vitro* digestion of the rapeseed oil-in-water emulsions. White bars: 553 mg tocopherols kg^{-1} oil and 0 µM metmyoglobin; grey bars: 553 mg tocopherols kg^{-1} oil and 20 µM metmyoglobin; black bars: <2 mg tocopherols kg^{-1} oil and 20 µM metmyoglobin. Means and standard deviations of three digestions except for 553 mg tocopherols kg^{-1} oil and 0 µM metmyoglobin, n=2.

In the presence of endogenous tocopherols in the emulsified oil and without addition of metmyoglobin, no O_2 consumption was noticed. When metmyoglobin (20 µM) was present, a low O_2 consumption was observed, particularly during intestinal phase. It reached 14 µmol O_2 g^{-1} lipids at the end of the incubation. When the digestion was performed without the endogenous tocopherols and in the presence of metmyoglobin, O_2 was gradually consumed. At the end of the intestinal phase, O_2 consumption (75 µmoles g^{-1} lipid) was 5 times higher than that obtained in the presence of tocopherols. These results show that the endogenous tocopherols of the emulsified rapeseed oil were efficient enough to limit lipid oxidation.

The time course of lipid oxidation in the presence of metmyoglobin was also assessed by the quantification of primary lipid oxidation compounds (hydroperoxides, Fig. 2A) and a

secondary oxidation marker (malonaldehyde Fig. 2B) arising from the decomposition of hydroperoxydes of polyunsaturated fatty acids.

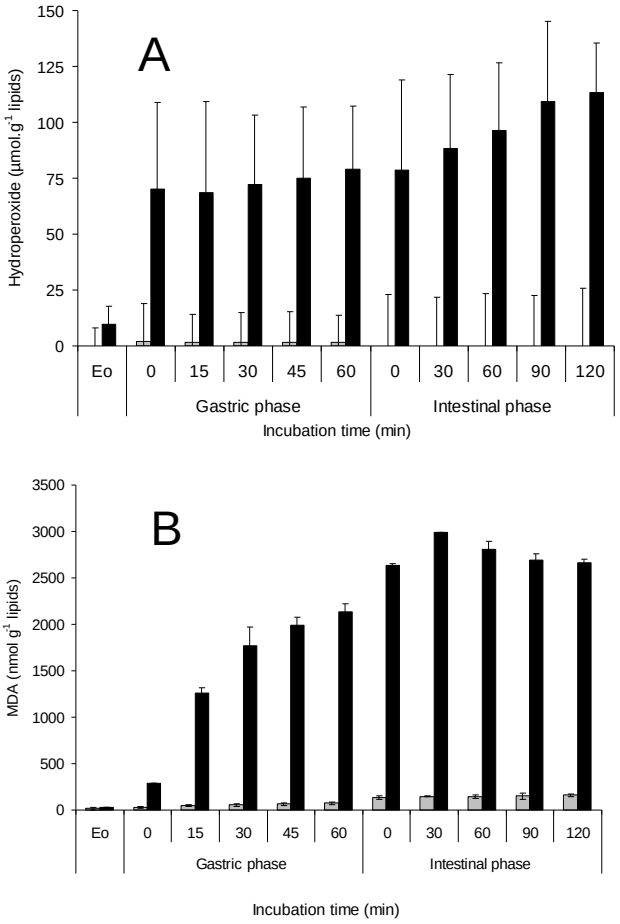


Figure 2. Formation of hydroperoxydes (A) and MDA (B) during *in vitro* digestion of the emulsions prepared with commercial rapeseed oil (553 mg kg^{-1} tocopherols) (grey) or with the purified oil (<2 mg kg^{-1} tocopherols) (black) in the presence of 20 µM metmyoglobin. Eo = fresh emulsions. Means and standard deviations (n=3).

Immediately after the addition of metmyoglobin, a dramatic increase (about 7 times) of the hydroperoxydes quantities was noticed for the emulsion without endogenous tocopherols. At the end of the intestinal phase, 113 ± 22 µmol hydroperoxides g^{-1} lipids were quantified. The amounts of MDA increased to 286 ± 1 nmoles g^{-1} lipids at the beginning of the gastric phase and reached 2139 ± 78 nmoles g^{-1} lipids at its end. During the first 30 min of the intestinal step, the amounts of MDA increased to 2837 ± 3 nmoles g^{-1} lipids, and decreased moderately afterwards. The initial increase of MDA quantities during the early step of the intestinal digestion could result from the decomposition of the hydroperoxides induced by some constituents of bile juice as suggested in previous works [1,31]. The later decrease of the

quantities of MDA could result from the formation of adducts between MDA and nucleophilic compounds [9,12] such as proteins and their hydrolysis products present in the intestinal medium.

During the digestion of the emulsions containing endogenous tocopherols, while a low O_2 consumption occurred (Fig. 1), HPX remained near or below the detection limit of the method (Fig. 2A) suggesting whether that the rates of formation and decomposition of hydroperoxides were similar or that no formation of HPX occurred. Conversely, the quantities of MDA increased from 28 ± 8 nmoles g^{-1} lipids to 73 ± 13 nmoles g^{-1} lipids (Fig. 2B) during the gastric phase, and were two time higher at the beginning of the intestinal phase. These quantities remained constant during the intestinal phase (163 ± 14 nmoles g^{-1} lipids at the end).

To make allowances between the physicochemical environment of the digestion (pH, temperature…) and the presence of enzymes and other constituents of the digestive fluids, we investigated lipid oxidation by replacing the simulated juices by a saline solution (control). The comparison of the amounts of hydroperoxides (Fig 3A) and MDA (Fig 3B) formed in both conditions highlighted that the presence of the simulated juices did not deeply modify lipid oxidation development during the gastric and intestinal phases. In our *in vitro* digestion system, lipid oxidation of a protein-stabilized emulsion seemed to be driven by the physico-chemical environment rather than by the digestive process itself.

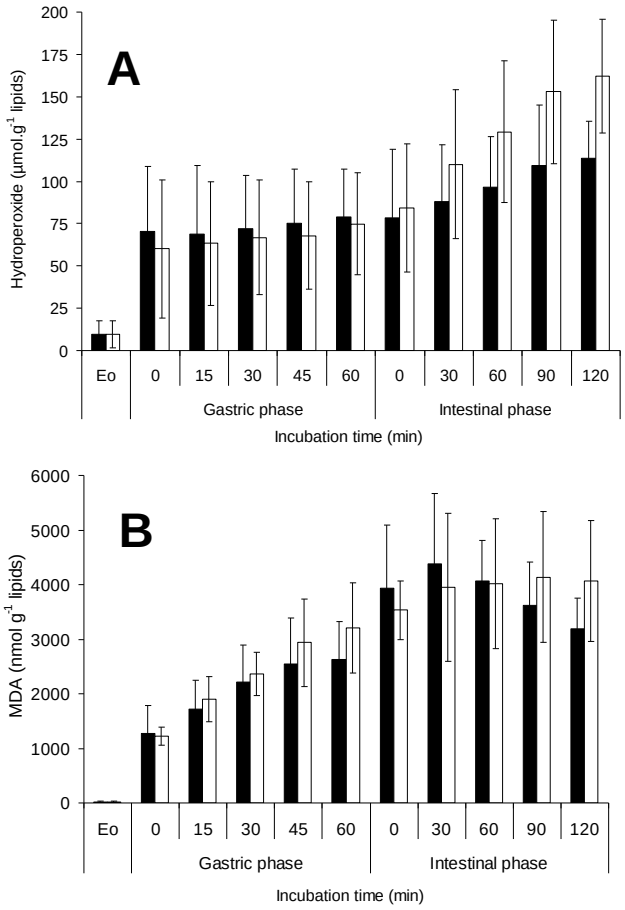


Figure 3. Impact of the presence of simulated gastric and intestinal fluids on the formation of hydroperoxydes (A) and malonaldehyde (B) during *in vitro* digestion of the oil-in-water emulsions prepared with purified rapeseed oil (< 2 mg kg^{-1} tocopherols). Black bars: in the presence of the digestive fluids; white bars: controls in the presence of 20 µM metmyoglobin. Means and standard deviations of three digestions.

Comparison of the quantities of hydroperoxides and MDA generated, either through lipid oxidation during digestion or within foods is of interest as this may determine their effective health implications. Therefore we compared the amounts of lipid oxidation produced during the simulated digestion with the amounts produced during accelerated oxidation of the purified rapeseed oil at 37°C.

Oxidation at 37 °C of the stripped rapeseed oil (containing low level of residual tocopherols) led to the detection of 137 µmoles hydroperoxides g^{-1} lipids after 8 days and 200 µmoles hydroperoxides g^{-1} lipids after 11 days. In presence of 20 µM metmyoglobin, after 60 minutes at 37°C in gastric conditions of the emulsion prepared with the same purified oil, amounts of hydroperoxides reached 80 µmoles g^{-1} lipids and 113 µmoles g^{-1} lipids after 120 minutes in intestinal conditions.

Similarly, MDA quantities were 225 nmoles g^{-1} lipids after 8 days and reached 626 nmoles. g^{-1} lipids after 11 days of incubation of the stripped rapeseed oil at 37°C. In the gastric conditions used in the present study, the MDA quantities increased from 286 nmoles to 2139 nmoles g^{-1} lipids after 60 minutes in gastric conditions. After additional incubation for 120 minutes in intestinal conditions, the MDA quantities reached 2663 nmoles g^{-1} lipids. The presence of endogenous tocopherols greatly reduced both the quantities of hydroperoxides and MDA, which levelled off at 73 nmoles g^{-1} lipids at the end of the gastric step and reached 163 nmoles g^{-1} lipids at the end of the intestinal phase. Without tocopherols and in presence of an initiator of lipid oxidation, the amount of MDA produced during the digestion was higher than that noticed during the accelerated oxidation of the corresponding oil. This highlights the importance of the antioxidants, not only for the protection of lipids in food but also during the digestion.

Previous studies on the effect of polyphenols on the oxidation of meat lipids during *in vitro* gastric conditions [30,32,35] reported concentrations of MDA (measured as TBA-RS) ranging from 25-60 µM without polyphenols to 11-20 µM after 180 min with polyphenols. In the present work, MDA concentrations in gastric media ranged from 4.5 to 130 µM after 60 min of incubation and in intestinal conditions from 5.3 to 87 µM after 120 min of incubation. The order of magnitude is similar, but differences such as the lipid content of the digested food and the way of quantification of MDA could partly explain them.

Our results evidence that the consumption of unsaturated lipids during a meal containing pro-oxidant species such as myoglobin can led to significant and noticeable increase of the quantities of hydroperoxides and MDA during the digestion. Works are under progress to confirm these results with long chain polyunsaturated fatty acids (tuna oil) and compare the amounts of lipid oxidation markers formed with the linoleic acid/linolenic rich vegetable oil to the quantities formed with the highly oxidizable marine substrate.

Standardization of the *in vitro* digestion procedures as well as of methods of measurement and expression of lipid oxidation would be necessary to better integrate and compare the researches related to lipid oxidation during digestion and its possible impact on health.

Acknowledgements

This work was supported by INRA and Région Pays de la Loire: PhD grant of H.B.K.-D., and by ANR (French National Research Agency) - program “Alimentation et industries alimentaires–Food and food industry”: ANR-08-ALIA-002 AGEcaninox project. Authors participate to the COST action FA1005 Improving health properties of food by sharing our knowledge on the digestive process (INFOGEST). Lucie Ribourg is acknowledged for her help in tocopherols quantification and for measurements of oxidation during accelerated oxidation of the oil.

References

1. Adhikari S, Joshi R, Gopinathan C (1998) Bilirubin as an anti precipitant against copper mediated denaturation of bovine serum albumin: formation of copper–bilirubin complex. Biochim Biophys Acta 1380(1):109–114

2. Armand M, Borel P, Pasquier B, Dubois C, Senft M, Andre M, Peyrot J, Salducci J, Lairon D (1996) Physicochemical characteristics of emulsions during fat digestion in human, stomach and duodenum. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 271(34): G172–G183

3. Armand M, Pasquier B, Andre M, Borel P, Senft M, Peyrot J, Salducci J, Portugal H, Jaussan V, Lairon D (1999) Digestion and absorption of 2 fat emulsions with different droplet sizes in the human digestive tract. Am J Clin Nutr 70(6):1096–1106

4. Awada M, Soulage CO, Meynier A, Debard C, Plaisancié P, Benoit B, Picard G, Loizon E, Chauvin MA, Estienne M, Peretty N, Guichardant M, Lagarde M, Genot C, Michalski MC (2012) Dietary oxidized n-3 PUFA induce oxidative stress and inflammation: role of intestinal absorption of 4-HHE and reactivity in intestinal cells. J Lipid Res 53(10):2069–2080

5. Baynes JW (2007) Dietary ales are a risk to human health-not. Mol Nutr Food Res 51:1102–1106

6. Bergamo P, Fedele E, Balestrieri M, Abrescia P, Ferrara L (1998) Measurement of malondialdehyde levels in food by high- performance liquid chromatography with fluorimetric detection. J Agric Food Chem 46:2171–2176

7. Berton C, Genot C, Ropers MH (2011) Quantification of unadsorbed protein and surfactant emulsifiers in oil-in-water emulsions. J Colloid Interface Sci 354(2):739–748

8. Berton C, Ropers MH, Viau M, Genot C (2011) Contribution of the interfacial layer to the protection of emulsified lipids against oxidation. J Agric Food Chem 59(9):5052–5061

9. Brogard M, Troedsson E, Thuresson K, Ljusberg-Wahren H (2007) A new standardized lipolysis approach for characterization of emulsions and dispersions. J Colloid Interface Sci 308(2):500–507

10. Cohn JS (2002) Oxidized fat in the diet, postprandial lipaemia and cardiovascular disease. Curr Opin Lipidol 13(1):19–24

11. Dobarganes C, Marquez-Ruiz G (2003) Oxidized fats in foods. Curr Opin Clin Nutr Metabol Care 6(2):157–163

12. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4 - hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radic Biol Med 11:81–128

13. Eymard S, Genot C (2003) A modified xylenol orange method to evaluate formation of lipid hydroperoxides during storage and processing of small pelagic fish. Eur J Lipid Sci Technol 205 (9):497–501

14. Garrett DA, Failla ML, Sarama RJ (1999) Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. J Agric Food Chem 47(10):4301–4309

15. Genot C, Meynier A, Riaublanc A (2003) Lipid oxidation in emulsions. In: Kamal-Eldin A (ed) Lipid oxidation pathways, vol 7. AOCS, Champaign, pp 190–244

16. Gorelik S, Ligumsky M, Kohen R, Kanner J (2008) The stomach as a “bioreactor”: when red meat meets red wine. J Agric Food Chem 56(13):5002–5007

17. Grau A, Guardiola F, Boatella J, Barroeta A, Codony R (2000) Measurement of 2-thiobarbituric acid values in dark chicken meat through derivative spectrophotometry: Influence of various parameters. J Agric Food Chem 48:1155–1159

18. Grootveld M, Atherton MD, Sheerin AN, Hawkes J, Blake DR, Richens TE, Silwood CJL, Lynch E, Claxson AWD (1998) In vivo absorption, metabolism, and urinary excretion of a, b-unsaturated aldehydes in experimental animals—relevance to the development of cardiovascular diseases by the dietary ingestion of thermally stressed polyunsaturate-rich culinary oils. J Clin Invest 101 (6):1210–1218

19. Herrero-Barbudo MC, Granado-Lorencio F, Blanco-Navarro I, Perz-Sacristan B, Olmedilla-Alonso B (2009) Applicability of an in vitro model to assess the bioaccessibility of vitamins a and E from fortified commercial milk. Int Dairy J 19(1):64–67

20. Kanazawa K, Ashida H (1998) Dietary hydroperoxides of linoleic acid decompose to aldehydes in stomach before being absorbed into the body. Biochim Et Biophys Acta-Lipids and Lipid Metabol 1393(2–3):349–361

21. Kanner J (2007) Dietary advanced lipid oxidation endproducts are risk factors to human health. Mol Nutr Food Res 51:1094–1101

22. Kanner J, Lapidot T (2001) The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant- derived antioxidants. Free Radic Biol Med 31(11):1388–1395

23. Kenmogne-Domguia HB, Meynier A, Viau M, Llamas G, Genot C (2012) Gastric conditions control both the evolution of the organization of protein-stabilized emulsions and the kinetic of lipolysis during in vitro digestion. Food Funct. 3:1302-1309

24. Lorrain B, Dangles O, Genot C, Dufour C (2010) Chemical modeling of heme-induced lipid oxidation in gastric conditions and inhibition by dietary polyphenols. J Agric Food Chem 58(1):676–683

25. Lorrain B, Dangles O, Loonis M, Armand M, Dufour C (2012) Dietary iron-initiated lipid oxidation and its inhibition by polyphe- nols in gastric conditions. J Agric Food Chem 60(36):9074–9081

26. Mendes R, Cardoso C, Pestana C (2009)Measurement of malondialdehyde in fish: a comparison study between HPLC methods and the traditional spectrophotometric test. Food Chem 112:1038–1045

27. Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Wolff SP (1995) Measurement of hydroperoxides in edible oils using ferrous oxidation in xylenol orange assay. J Agric Food Chem 43(1):17–21

28. Seljeskog E, Hervig T, Mansoor MA (2006) A novel HPLC method for the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). A comparison with a commercially available kit. Clin Biochem 39:947–954

29. Staprans I, Rapp JH, Pan XM, Feingold KR (1996) Oxidized lipids in the diet are incorporated by the liver into very low density lipoprotein in rats. J Lipid Res 37:420–430

30. Tagliazucchi D, Verzelloni E, Conte A (2010) Effect of dietary melanoidins on lipid peroxidation during simulated gastric digestion: their possible role in the prevention of oxidative damage. J Agric Food Chem 58(4):2513–2519

31. Terao J, Ingemansson T, Ioku K, Yuki H, Ito Y (1995) Effects of rat bile–pancreatic juice on Fe^{2+} induced peroxidation of phospholipids. Biosci Biotechnol Biochem 59(1):55–58

32. Tesoriere L, Butera D, Gentile C, Livrea MA (2007) Bioactive components of caper (Capparis spinosa L.) from Sicily and antioxidant effects in a red meat simulated gastric digestion. J Agric Food Chem 55(21):8465–8471

33. Tyssandier V, Reboul E, Dumas JF, Bougteloup-Demange C, Armand M, Marcand J, Sallas M, Borel P (2003) Processing of vegetable-borne carotenoids in the human stomach and duodenum. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 284(6):G913–G923

34. Ursini F, Zamburlini A, Cazzolato G, Maiorino M, Bon GB, Sevanian A (1998) Postprandial plasma lipid hydroperoxides: a possible link between diet and atherosclerosis. Free Radic Biol Med 25(2):250–252

35. Verzelloni E, Tagliazucchi D, Conte A (2010) From balsamic to healthy: traditional balsamic vinegar melanoidins inhibit lipid peroxidation during simulated gastric digestion of meat. Food Chem Toxicol 48(8–9):2097–2102

36. Villière A, Viau M, Bronnec I, Moreau N, Genot C (2005) Oxidative stability of bovine serum albumin and sodium caseinate-stabilized emulsions depends on metal availability. J Agric Food Chem 53(5):1514–1520

IV-2-2-2- Évolution des marqueurs spécifiques des AGPI

Les mesures d'oxydation avaient également pour but de quantifier des produits spécifiques de l'oxydation des AGPI n-3 et n-6 que sont, le 4-HHE et le 4-HNE. La figure 29 présente la formation des 4-HNE et 4-HHE au cours de la digestion des émulsions d'huile de colza purifiée en présence de metmyoglobine.

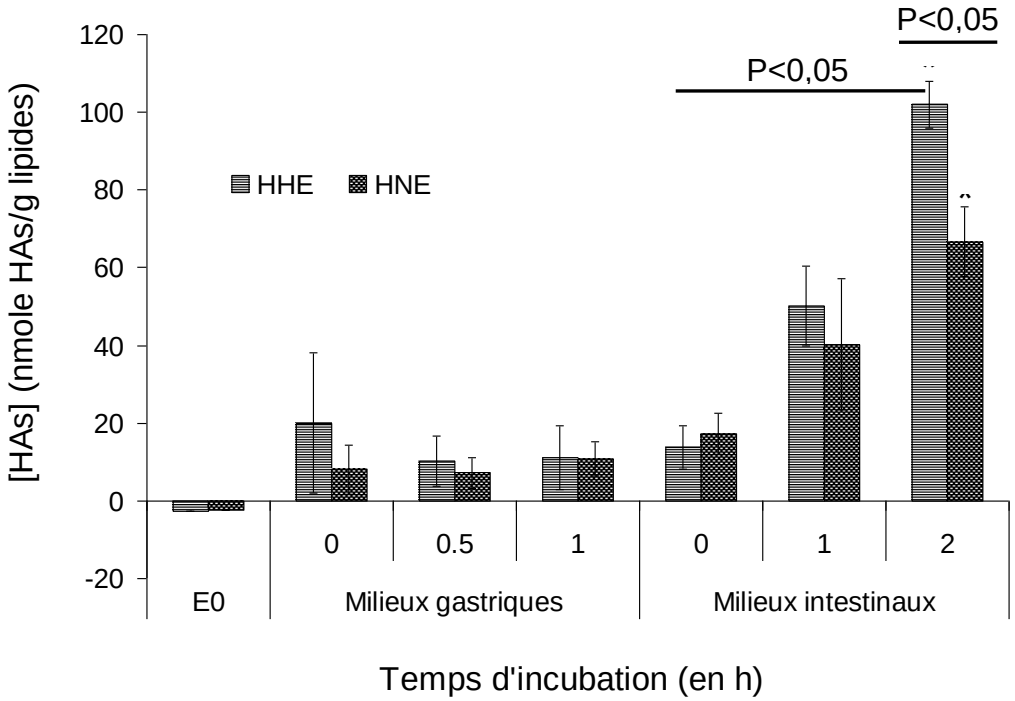


Figure 29. Formation du 4-HHE et du 4-HNE au cours de la digestion *in vitro* de l'émulsion d'huile de colza purifiée en présence de metmyoglobine. Les barres d'histogramme présentent les moyennes, les barres d'écarts types représentant ceux de mesures effectuées en triple.

La figure 29 montre qu'en présence de metmyoglobine, il y a une production de faibles quantités de 4-HHE et 4-HNE pendant la phase gastrique. Ces quantités restent constantes pendant toute la phase gastrique et le début de la phase intestinale. Comparées aux quantités de MDA et d'HPX formés, ces quantités restent cependant très faibles, suggérant une orientation de la dégradation préférentielle des hydroperoxydes d'AGPI vers la production du MDA plutôt que des hydroxyalcénals.

Une heure après ajout des sucs pancréatico-biliaires aux milieux gastriques et incubation, on note une augmentation importante et significative de la quantité de 4-HHE et de 4-HNE, quantités qui augmente encore significativement une heure plus tard. Alors qu'après une heure d'incubation, la quantité de 4-HHE est légèrement supérieure à la quantité de 4-HNE, cette différence devient significative après deux heures d'incubation. Rapportés à

la composition en AGPI de l'huile de colza constituée à 19% d'acide linoléique (n-6) et à 10% d'acide α-linolénique (n-3), ces résultats confirment que les AG contenant trois doubles liaisons (ALA) sont plus oxydables que les AG qui n'en ont que deux (LA). En effet, bien que contenant 2 fois plus d'acide linoléique que d'acide α-linolénique, la quantité de 4-HHE est, après 2 heures d'incubation, significativement supérieure à la quantité de 4-HNE spécifique à l'oxydation des AGPI n-6.

Précédemment (cf article 2), nous avions constaté que les quantités d'HPX et de MDA formés au cours de la digestion étaient similaires en présence et en absence des sucs digestifs. Les quantités d'HAs mesurées dans les milieux essais (avec sucs digestifs) et témoins (sans sucs digestifs) ont donc été comparées (figures 30 A et B).

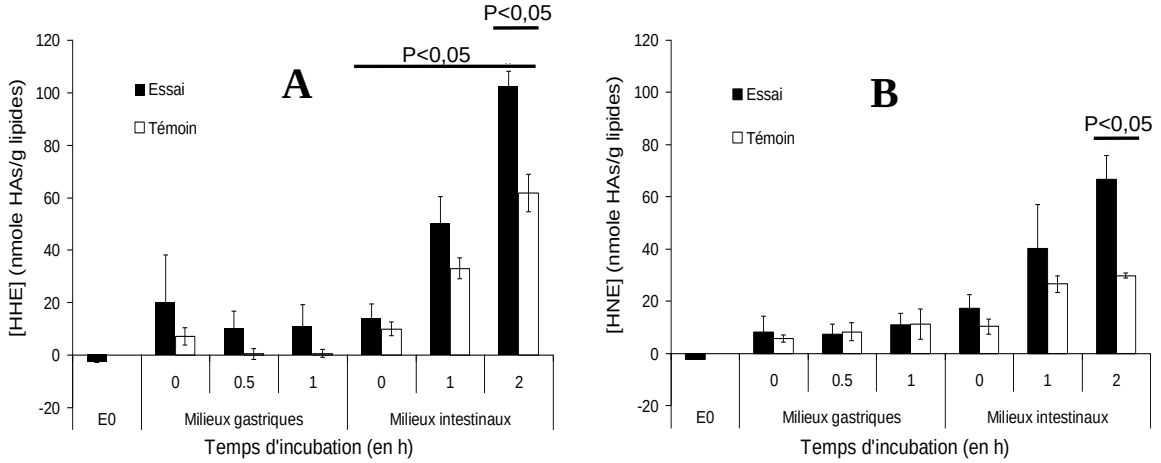


Figure 30. Quantités de 4-HHE (A) et de 4-HNE (B) dans les milieux digestifs essais et témoins préparés à partir d'émulsion d'huile de colza purifiée en présence de metmyoglobine. Les bandes d'histogramme présentent les moyennes, les barres représentant les écarts types de mesures effectuées en triple.

Les résultats montrent que, alors que les marqueurs globaux de l'oxydation des lipides (HPX et MDA) ne sont pas sensibles à la présence ou non de sucs digestifs, les marqueurs spécifiques tels que le 4-HHE et le 4-HNE le sont. Une nette augmentation des quantités de 4-HHE et de 4-HNE est observée en présence des sucs pancréatico-biliaires, mais pas en présence du suc gastrique. Ceci pourrait être lié, d'une part à l'émulsification intestinale qui conduit dans les milieux essais, à l'augmentation de l'aire interfaciale, plus propice à l'oxydation des AGPI. D'autre part, certains constituants des sucs pancréatico-biliaires pourraient accélérer la décomposition des hydroperoxydes (Terao *et al.*, 1995). Ces résultats soulignent à nouveau l'importance de la prise en compte de différents marqueurs lors de l'étude de l'oxydation des lipides.

IV-2-2-3- Effet du niveau initial d'oxydation des lipides (hydroperoxydes) sur l'oxydation au cours de la digestion

Compte tenu de l'importance de l'état initial d'oxydation dans le déroulement de l'oxydation des lipides dans les aliments, nous avons voulu savoir s'il en était de même pour l'oxydation des lipides au cours de la digestion. Les cinétiques d'oxydation au cours de la digestion ont, de ce fait, été évaluées pour des concentrations croissantes en hydroperoxydes dans l'huile de colza utilisée pour la préparation des émulsions. Ces concentrations étaient de 5 µmol g^{-1} de lipides (inférieur au seuil de mises sur le marché des huiles alimentaires qui est de 10 µmol g^{-1} de lipides) et de 60 µmol g^{-1} de lipides. Ces concentrations ont été obtenues en soumettant les huiles à une oxydation thermique accélérée en système clos et à l'obscurité. Les figures 31 présentent les quantités d'HPX et de MDA formées dans les émulsions et les milieux gastriques obtenus à partir de d'huile contenant initialement 5 µmol d'HPX par gramme de lipides.

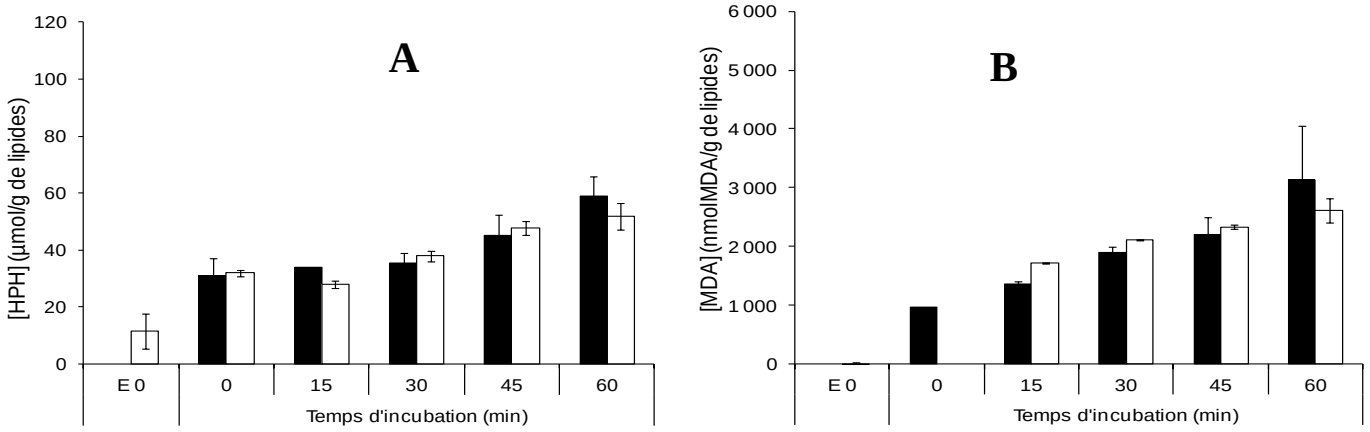


Figure 31 : Quantités d'HPX (A) et de MDA (B) formés dans les émulsions et les milieux gastriques essais (barres noires) ou témoins (barres blanches) pour une concentration initiale en HPX de l'huile de colza de 5 µmol g^{-1} de lipides. (n = 1 digestion avec 2 mesures)

La figure 31 nous montre que pour une concentration initiale en HPX des huiles de 5 µmol g^{-1} de lipides, pendant la phase gastrique, les quantités de produits d'oxydation (HPX et MDA) formés ne sont pas différentes de celles obtenues avec des émulsions préparées à partir d'huile non oxydée (cf article 2).

Les figures 32 quant à elle présentent la consommation d'oxygène et les quantités d'HPX et de MDA formés dans les émulsions et les milieux gastriques et intestinaux obtenus à partir de d'huile contenant initialement 60 µmol d'HPX par gramme de lipides.

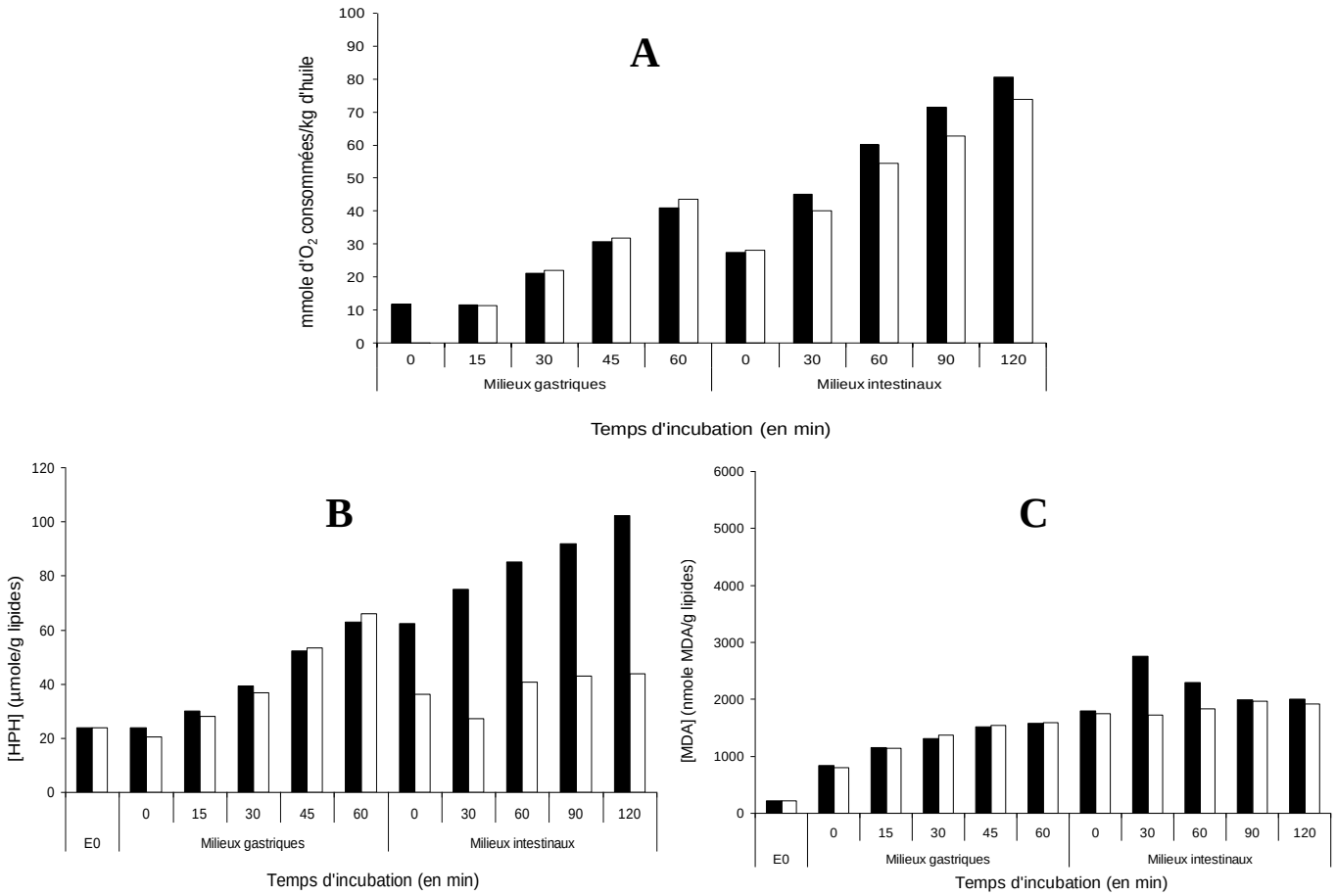


Figure 32 : Quantités d'oxygène consommé (A), d'HPX formés (B) et de MDA formé (C) dans les émulsions et les milieux gastriques et intestinaux essais (barres noires) ou témoins (barres blanches) pour une concentration initiale en HPX de l'huile de colza de 60 µmol g^{-1}de lipides. (n = 1 digestion avec 2 mesures pour le dosage des HPX et MDA).

Bien que la concentration en HPX initiale dans l'huile utilisée pour la fabrication de l'émulsion ait été ajustée à 60 µmole g^{-1}, après émulsification, la quantité d'HPX dosée dans l'émulsion et rapportée aux lipides émulsifiés n'est que de 24 µmole g^{-1}. Ceci montre qu'au cours du procédé d'émulsification, plus de la moitié des HPX initialement présents dans les huiles se sont décomposés. Ce phénomène, qu'on ne retrouve pas dans le cas de l'émulsion d'huile faiblement oxydée, expliquerait en partie les quantités élevées de MDA initialement présentes dans les émulsions d'huiles de colza fortement oxydée, ce qui n'est pas le cas pour celles d'huiles faiblement oxydée.

Ces résultats montrent, en comparaison avec ceux obtenus pour les émulsions d'huile non oxydée que, dans les conditions digestives utilisées, quelle que soit la concentration initiale en HPX des huiles émulsifiées soumises à la digestion *in vitro*, il n'y a pas d'effet notable sur les quantités de marqueurs d'oxydation formées au cours de la phase gastrique. Lors de la phase intestinale, en comparant les résultats de la figure 31 à ceux obtenus avec

une huile initialement non oxydée (cf article 2), la même observation est effectuée. Cependant, la figure 31 B laisse supposer un effet pro-oxydant possible des sucs pancréatico-biliaires sur la formation des HPX, effet qui n'est toutefois pas observé au niveau de la consommation d'oxygène ou de la formation de MDA. Ceci est en accord avec les travaux de Waraho et ses collaborateurs qui ont montré que les hydroperoxydes d'acide oléique n'augmentaient pas la vitesse d'oxydation lorsqu'ils étaient ajoutés dans des émulsions d'huile de soja purifiée (Waraho *et al.*, 2009). Pour l'huile fortement oxydée, on note une évolution différente des HPX dans les milieux intestinaux essais comparés aux témoins. En effet, alors que la concentration en HPX diminue presque de moitié et reste constante tout au long de la phase intestinale dans les milieux témoins, elle continue d'augmenter dans les milieux essais de façon identique aux milieux obtenus avec l'huile non oxydée.

IV-2-3- Effet de la nature de chaines d'acides gras (insaturation et longueur de chaine) sur l'oxydation des lipides émulsionnés au cours de la digestion

Les résultats présentés dans cette partie complètent ceux figurant dans l'article 3 de ce manuscrit.

Afin de déterminer l'effet de la composition en AGPI de l'huile émulsifiée sur l'oxydation des lipides, les résultats obtenus pour les émulsions d'huile de colza (63% d'AGMI, 19% de LA, 10% de ALA et 553 µg tocophérol g^{-1} d'huile) dépourvue ou non de ses tocophérols ont été comparés à ceux obtenus avec l'émulsion AGPI n-3 LC-SAB contenant 53% d'AGMI, 10% de LA, 18% de DHA + EPA et 544 µg tocophérol g^{-1} d'huile. La figure 33 présente la consommation d'oxygène par les milieux digestifs.

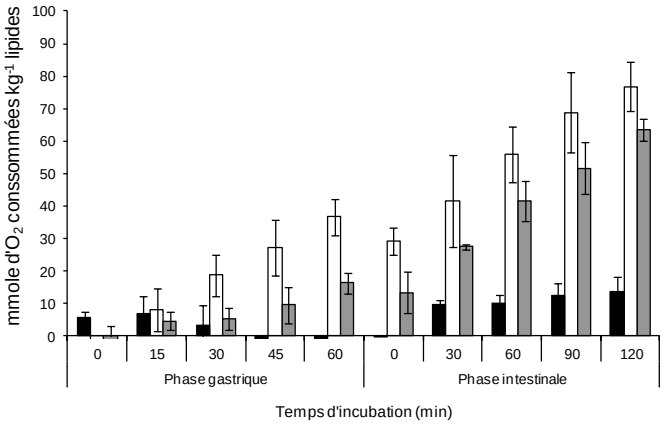


Figure 33 : Consommation d'O2 dans les milieux essai d'émulsion colza-SAB avec (bande noire) ou sans tocophérols (bande blanche) ou d'émulsion AGPI-LC n-3-SAB (bande grise). (n = 3 digestions indépendantes).

Il ressort de ce graphe que la quantité d'O_2 consommée par les milieux digestifs contenant l'émulsion AGPI n-3 LC-SAB est, à partir de 45 min d'incubation gastrique et ce jusqu'en fin de phase intestinale, au moins 4 fois plus importante que celle obtenue avec l'émulsion d'huile de colza contenant la même quantité d'antioxydants. Ceci s'explique en effet par la plus grande oxydabilité des AGPI LC présents dans le mélange d'huile comparés aux AGPI (EPA et ALA) présents dans l'huile de colza. Comparée à l'émulsion d'huile de colza dépourvue d'antioxydants, la consommation d'O_2 est moins importante avec l'émulsion AGPI-LC n-3-SAB. En résumé, l'oxydation est importante dans l'émulsion AGPI-LC n-3-SAB du fait de sa composition en AGPI LC très oxydable, mais du fait de la présence de tocophérols qui exercent leur fonction antioxydante, elle demeure moins importante que dans l'émulsion contenant uniquement de l'ALA sans tocophérols.

L'évaluation de la consommation d'O_2 permet ainsi de mettre en évidence l'effet de la présence d'AGPI LC dans les huiles. En vu de vérifier cet effet pour des marqueurs d'oxydation plus spécifiques, le même raisonnement à été adopté pour les HPX et le MDA (figure 34).

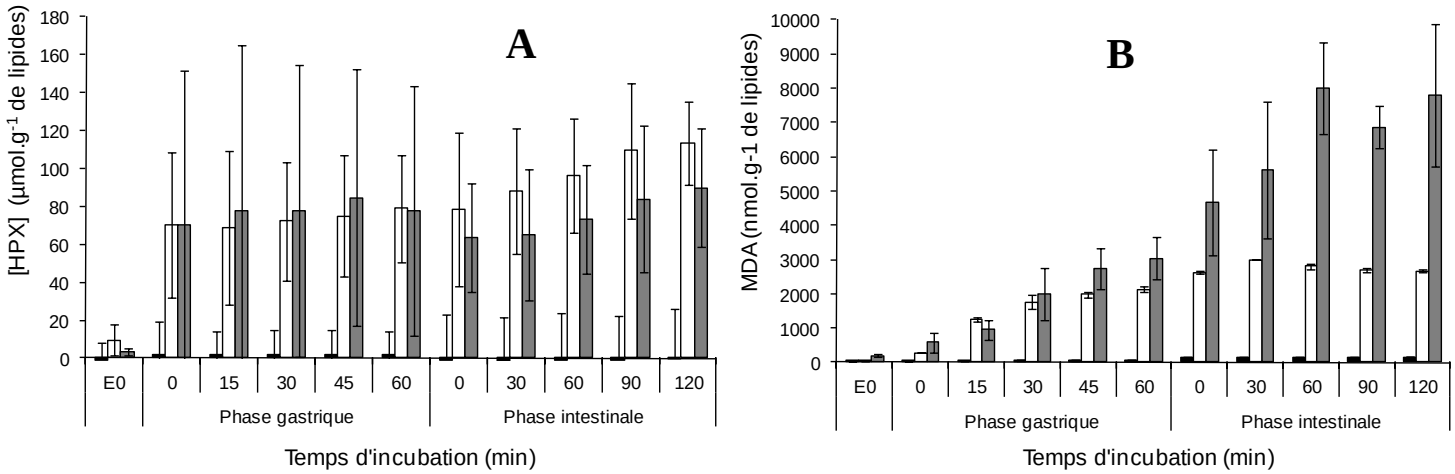


Figure 34 : Quantités d'HPX formés (A) et de MDA formé (B) dans les émulsions et les milieux essai d'émulsion colza-SAB avec (bande noires) ou sans tocophérols (bande blanches) ou d'émulsion AGPI-LC n-3-SAB (bande grise). (n = 3 digestions indépendantes).

Les résultats montrent que les quantités d'hydroperoxydes et de MDA dans les milieux issus des émulsions riches en EPA et DHA sont au moins 15 fois supérieures comparées aux quantités mesurées dans les émulsions d'huile de colza contenant une même quantité de tocophérols et dont la taille des gouttelettes est identique. Ces résultats confirment donc que s'ils sont suffisants pour protéger l'huile de colza (18 :2 n-6, 18 :3 n-3), les tocophérols présents dans l'émulsion contenant des AGPI-LC ne sont pas suffisants pour

protéger les lipides de l'oxydation. De plus, il apparait que si au cours la digestion de l'émulsion d'huile de colza, les quantités de MDA évoluaient peu en phase intestinale, il en est tout autre dans le cas l'émulsion contenant de l'EPA et du DHA. Ainsi, comparées aux quantités détectées en fin de phase gastrique, on observe une augmentation après l'ajout des sucs pancréatico-biliaires, qui se poursuit tout au long de la phase intestinale. Après une heure d'incubation intestinale, les quantités de MDA sont au moins doubles par rapport à celles mesurées en fin de phase gastrique.

Ces résultats confirment qu'en conditions digestives, comme dans les aliments, la présence des AGPI LC dans les lipides leur confère une plus grande oxydabilité, y compris en phase intestinale, qu'il convient donc de palier par la présence d'antioxydants.

En vue d'évaluer la contribution spécifique des deux familles d'AGPI à l'oxydation, le 4-HHE et le 4-HNE ont également été quantifiés dans ces milieux (figure 35).

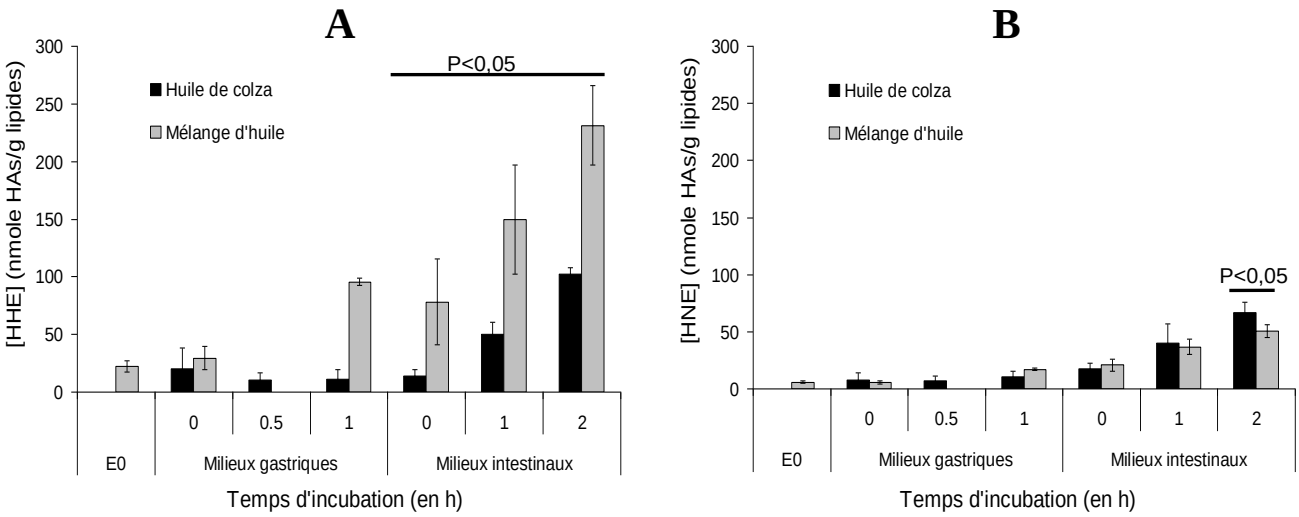


Figure 35 : Effet de la composition en acides gras des émulsions stabilisées par la SAB sur la formation du 4-HHE (A) et du 4-HNE (B) dans les milieux digestifs « essais » lors de la digestion en présence de metmyoglobine. Les bandes d'histogramme présentent les moyennes, les barres représentant les écarts types de mesures effectuées sur 3 digestions indépendantes. Les teneurs en tocophérols sont équivalentes.

Nous pouvons noter que quelle que soit la composition en AGPI des huiles utilisées, la quantité de 4-HNE, spécifique à l'oxydation des n-6, formée est inférieure à la quantité de 4-HHE spécifique à la quantité de n-3 présent dans les milieux. Si cette observation est en accord avec la composition de l'émulsion riche en EPA et en DHA dont le rapport n-6/n-3 est de 0,6, ce n'est pas, à première analyse, le cas pour l'émulsion d'huile de colza pour laquelle le rapport n-6/n-3 est de 1,9. Ce résultat lié au fait que le 18:3 n-3, présent dans l'huile de colza est plus oxydable que le 18:2 n-6, alors que dans le cas du mélange lipidique contenant

des AGPI-LC, la présence d'EPA et de DHA déterminent l'oxydation de l'huile au cours de la digestion, en accord avec son indice de peroxydabilité 2 fois plus important que celui de l'huile de colza. Cette différence, liée à l'oxydabilité des huiles, se retrouve également sur les quantités de 4-HHE selon la nature des AGPI n-3 qui compose les huiles. En effet, pour l'émulsion d'huile riche en AGPI LC, les quantités de 4-HHE formées sont très importantes en fin de phase gastrique comparativement à celle obtenue pour l'émulsion d'huile de colza, témoignant de la rapidité de l'oxydation des huiles riches en AGPI LC. Cet écart en fin de phase gastrique, qui est de l'ordre de 8 fois, diminue progressivement pour n'être plus qu'environ de 2 fois en fin de phase intestinale. En fin de digestion, le rapport de deux entre les quantités de 4-HHE pourrait être lié à la quantité de n-3 deux fois plus élevée dans l'émulsion d'huile riche en EPA et DHA par rapport à l'émulsion d'huile de colza.

IV-2-4- (Article 4) Effet de la taille des gouttelettes lipidiques, de la nature des émulsifiants et de la composition des milieux digestifs sur l'oxydation des lipides

In preparation for submission to Food Chemistry

Kinetics of lipid oxidation during the *in vitro* digestion of emulsions containing long chain n-3 fatty acids depend on the initial organization of the emulsions and the composition of the digestive media.

Une partie des résultats présentés ont été obtenus lors des stages Master II Science de l'Aliment et Nutrition Humaine (option Nutrition Humaine) et d'ingénieur de l'école ONIRIS (Nantes) de Stéphanie Moisan et font partie des mémoires qu'elle a rédigés.

Kinetics of lipid oxidation during the *in vitro* digestion of emulsions containing long chain n-3 fatty acids depend on the initial organization of the emulsions and the composition of the digestive media.

Hernan Brice Kenmogne-Domguia, Stéphanie Moisan, Michèle Viau, Claude Genot, Anne Meynier *

INRA, UR1268 Biopolymères Interactions Assemblages, F-44316 Nantes Cedex 3, France

**corresponding author*

anne.meynier@nantes.inra.fr

phone: 33 240675245, fax 33 240675084

Abstract

This work aimed at evaluating the effect of digestive fluids, interface and lipid droplet sizes on the oxidative fate of oil-in-water emulsions containing long chain n-3 fatty acids. Emulsions stabilised either by a protein or by phosphatidyl-choline/Tween 80 were submitted to gastric and intestinal *in vitro* conditions with limited amounts of available oxygen and in the presence of metmyoglobin. During the gastric phase, while oxygen consumption and formation of hydroperoxides, malonaldehyde, 4-hydroxy-2-hexenal, and 4-hydroxy-2-nonenal remained limited when tocopherol quantities decreased in surfactants stabilized emulsion, in protein stabilized one, the quantities of these markers are higher. During the intestinal step for phospholipid-stabilised emulsions, tocopherol amounts, similar whatever the presence or not of simulated digestive fluids, rapidly reached low levels before oxidation took place. In protein stabilized emulsion, oxidation levels were similar with and without the fluids while higher quantities of oxidation markers were formed without fluids in phospholipid-stabilised one, showing some possible protecting effect of the fluid components against oxidation.

Keywords: *in vitro* digestion, emulsion, interface, protein, phospholipid, MDA, 4-HHE, 4-HNE ,tocopherol

Highlights

- Presence of digestive juices affects differently the oxidative fate of BSA or surfactant stabilised emulsions under *in vitro* conditions

- Lipid oxidation occurs both during the gastric and the intestinal phases of the *in vitro* digestion
- The extent of lipid oxidation at the end of the digestion in presence of the digestive juice is similar whatever the initial composition of the interface and the mean diameter of the droplets

1. Introduction

Over the past 30 years, n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) have been recognized for their potent impact in disease prevention such as cardiovascular diseases. Dietary recommendations are to re equilibrate our intake of polyunsaturated fatty acids by a decrease of our consumption of n-6 fatty acids and increase of the consumption of n-3 PUFA (EFSA, 2010). Market of dietary supplements and n-3-enriched foods has accordingly dramatically increased since the beginning of the 2000's. However, n-3 PUFA are highly oxidizable species. Thus one challenge for the food industry is to guarantee the oxidative stability of the enriched-foods during the whole production-to-consumption chain. In fact, it remains actually unresolved whether the chronic consumption of low amounts of lipid oxidation products can or not present health hazards (Baynes, 2007; Kanner, 2007). On the one hand, it is generally accepted that rancid or unpleasant smell or taste associated to lipid oxidation prevents the consumption of large amounts of lipid oxidation products by consumers (Dobarganes et Marquez-Ruiz, 2003). On the other hand, both primary (hydroperoxides) and secondary products (*trans*-alkenals) of lipids oxidation can be absorbed in the intestine (Staprans *et al*., 1996; Grootveld *et al*., 1998; Kanazawa et Ashida, 1998; Ursini *et al*., 1998; Awada *et al*., 2012). Accumulating evidences suggest that dietary oxidized lipids can contribute to the pathogenesis of disease such as atherosclerosis (Cohn, 2002).

The lipid oxidation products can be either present in the consumed foods or formed throughout the digestive tract. In fact, in the early 2000's Kanner et al postulated that the stomach can act as a bioreactor towards lipid oxidation (Kanner et Lapidot, 2001; Gorelik *et al.*, 2008). It was also shown that antioxidants such as phenolic compounds can prevent this reaction (Kanner et Lapidot, 2001; Lorrain *et al*., 2010; Lorrain *et al*., 2012). To evaluate the potential health hazard linked to the consumption of large amount of polyunsaturated lipids, it is therefore of central importance to evaluate the oxidative fate of the unsaturated lipids during digestion. In a previous study (Kenmogne-Domguia *et al*., 2012a), we have shown that the composition of the bolus, in particular the presence of lipophilic antioxidant and/or prooxidant species, is critical for the oxidative fate of emulsified lipids during digestion of

protein stabilized containing ALA as the only PUFA. This study has also shown that for such an emulsion, the physicochemical conditions of the digestion, rather than the constituents of the simulated digestive fluids seem to favour lipid oxidation.

The aim of this work was to evaluate the effect of digestive fluids and the interface on the oxidative fate of lipids in model oil-in-water emulsion containing long chain n-3 fatty acids. A protein-stabilised model emulsion, already set up in a previous work (Kenmogne-Domguia *et al*., 2012a), was prepared with a lipid blend containing long chain n-3 fatty acid from marine oil. Another emulsion stabilised by a mixture of Tween 80 and phosphatidyl-choline was also formulated to obtain a similar fatty acid composition than the protein-stabilised emulsion. The emulsions were put in simulated *in vitro* digestive conditions, including gastric and intestinal phases, the protocol being adapted to avoid the permanent contact of the digestive media with ambient air (Kenmogne-Domguia *et al*., 2012b). A pH equal to 2.5 was chosen for the simulated gastric phase because it corresponds to a mean value of the pH of the gastric medium in the fasted state (Armand *et al*., 1996; Armand *et al*., 1999; Tyssandier *et al*., 2003), and because some studies suggest that an acidic pH favours lipid oxidation (Kanner et Lapidot, 2001; Genot *et al*., 2003). Metmyoglobin was chosen as initiator of lipid oxidation because this highly redox-active heme form of dietary iron is present in food bolus after meat consumption. Lipid oxidation was assessed by three complementary markers namely oxygen consumption, formation of hydroperoxides (HPX) and malonaldehyde (MDA), respectively primary and secondary products of lipid oxidation. Specific markers of the oxidation of n-3 fatty acids (4-hydroxy-2-hexenal: 4-HHE) and n-6 fatty acids (4-hydroxy-2-nonenal: 4-HNE) were also quantified (Guichardant *et al*., 2004). Finally, to point out the role of the physico-chemical conditions of the digestion and digestive process itself, including the constituents of the digestive fluids, in the oxidative fate of lipids, control experiments were performed without the simulated gastric and intestinal fluids (SGF and SIF).

2. Materials and Methods

2.1. Lipids and emulsifiers

Oleic sunflower oil was furnished by Olvéa (St Léonard, France). It contained oleic acid (85.0 ± 0.2% of total fatty acids), linoleic acid (7.9 ± 0.1%) as major fatty acids and 416 ± 21 mg kg^{-1} tocopherols, mainly as α-tocopherol. Sunflower oil was by in a local supermarket (Lesieur, France). It contained linoleic acid (60.6 ± 0.3 %), oleic acid (28.6 ± 0.1%), and palmitic acid (6.9 ± 0.2) as major fatty acids and 331 mg kg^{-1} tocopherols, mainly α-

tocopherol. Flavourless tuna oil was a gift from Polaris (Peuven, France). Its major fatty acids were DHA (26.1 ± 1.1 %), palmitic (22.5 ± 0.9%), oleic (17.9 ± 0.3%), and EPA (6.9 ± 0.2) and its tocopherol content 851 ± 25 mg kg-1 oil, mainly α-tocopherol and γ-tocopherol. Oleic sunflower and sunflower oil were purified on alumina to remove tocopherols (Berton et al., 2011). Stripped oils contained less than 2 mg. kg^{-1} tocopherols.

Tween 80 (Polyethylene glycol sorbitan mono-oleate) was sold by Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Falavier, France). Oleic acid was its prominent fatty acid with 83.4 ± 1.3 % of total fatty acids. Other fatty acids were palmitic (5.0 ± 0.3%) and gadoleic (5.6 ± 0.4%) acids.

Bovine serum albumin (BSA; Cohn Fraction V Powder, 95-98%) was purchased from MP Biomedical. Lecithin P100 from soybean was purchased from Lipoid (Ludwigshafen, Germany). This lecithin contained only phosphatidyl-choline. Linoleic acid accounted for 51.5 ± 0.6 % of total fatty acids, palmitic acid for 15.6 ± 0.3 %, oleic acid for 13.0 ± 0.9 % and α- linolenic acid for 4.5 ± 0.1%. It was also stabilised by high amount of α-tocopherol (1348 ± 63 mg kg^{-1} lipids).

2.2. Chemicals for in vitro digestion

Mucin (type 2 from porcine stomach), pepsin (from porcine gastric mucosa, 2500-3500 units mg-1 protein), metmyoglobin (from equine skeletal muscle), pancreatin (porcine pancreas, 8xUSP specification), lipase (type II, crude from porcine pancreas), and bile extract (porcine) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Company (Saint-Quentin Fallavier, France). The bile extract contained 1-5% hyodeoxycholic acid, 0.5-7% deoxycholic acid, 0.5-2% cholic acid, 10-15% glycodeoxycholic acid and 3-9% taurodeoxycholic acid as stated by the supplier.

2.2. Other chemicals

Chemical reagents and solvents were of analytical grade: potassium chloride (99.5%, Merck), sodium chloride (100%, VWR Prolabo), sodium bicarbonate (99.5%, Carlo Erba), hydrochloric acid (37%, Carlo Erba), calcium chloride (97%, Sigma), butylated hydroxytoluene (99%, SAFC), ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (99%, Panreac), trichloroacetic acid (≥99%, Sigma-Aldrich), 1,1,3,3-Tetraethoxypropane (97%, Sigma), 2-thiobarbituric acid (98%, Sigma), sodium hydroxide (>97%, Carlo Erba), ethyl alcohol (≥99.9%, Carlo Erba), sodium phosphate monobasic (98-100.5%, Sigma Aldrich), methyl alcohol (≥99.9%, Carlo Erba), acetonitrile (>99.9%, Biosolve BV), propan-2-ol (≥99.9%, Carlo Erba), hexane (>99.9%, Carlo Erba), ferrous ammonium sulfate (>99%, Fluka), xylenol orange tetrasodium salt (Fluka), hydrogen peroxide (30%, Fluka), sulfuric acid (96%, Carlo

Erba), alumina (N-super I, MP Biomedicals), citric acid anhydrous (>99.9%, Fluka), O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine hydrochloride (PFBHA : >99%, Fluka), N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA : >99%, Fluka), piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid) (PIPES : >99%, Sigma).

2.4. Preparation of the emulsions

In the present work, two emulsions were prepared. They were characterised by similar fatty acid compositions and contents but different emulsifiers and droplet size distribution. These fatty acid compositions and the tocopherol contents of the emulsions are presented in the supplementary data (table 1 and 2). Oleic sunflower and sunflower oil have been stripped from their endogenous tocopherols to reach in the lipid blend the same content of tocopherols close to 500 mg kg^{-1} lipids than previously (Kenmogne-Domguia et al., 2012b).

2.4.1. Protein-stabilised emulsion

Seven and half grams of tuna oil (50 % w/w) were added to 6.5 g (43.3 % w/w) of stripped oleic sunflower and 1 g (6.7 % w/w) of stripped sunflower oil. Fifteen grams of this lipid blend were then emulsified with 35 g of solution of BSA (5g L^{-1}) in saline solution (120 mM NaCl, 6 mM $CaCl_2$, 5 mM KCl) as described previously (Kenmogne-Domguia *et al*., 2012b). The resulting emulsion was characterised by narrow monomodal distributions and mean droplet sizes ($d_{4,3}$) of 1.7 ± 0.1 µm.

2.4.2. Phospholipid-stabilised emulsion

Seven and half grams of tuna oil (50 % w/w) were added to 6.5 g (43.3 % w/w) of stripped oleic sunflower oil. One gram of lecithin (1% w/w) was then dispersed in the oily blend. Thirty five grams of the saline solution containing 250 mg of Tween 80 were then added and premixed with a rotor stator (Polytron PT 3000 Kinematica, Littau, Switzerland) at 15 000 rpm for 3 min. The coarse emulsion was then homogenised for 10 min at 1500 bars at 10°C and under nitrogen to avoid warming up and oxidation of the emulsion (EmulsiFlex C3, Avestin). The mean diameter of the droplets was 205 nm. The emulsion that contained phosphatidyl-choline as the major emulsifier was further called ‘phospholipid-stabilised emulsion’.

2.5. In vitro digestion model

The compositions of the simulated digestive fluids have been detailed previously (Kenmogne-Domguia et al., 2012a) with the modifications required by the aim of measuring lipid oxidation (Kenmogne-Domguia *et al*., 2012b). Briefly, the emulsion (3.36 mL) and the simulated gastric fluid (SGF, 1.89 mL, containing 2.7 g L^{-1} mucin and 6.7 g L^{-1} pepsin) were added into 20.5 mL headspace vials. The pH was adjusted to 2.5 by the addition of a predefined volume of 1M HCl (32.2 µL). Metmyoglobin solution (20 µM in the gastric media) was added before pH adjustment. The vials were sealed with Teflon/silicon septa and aluminium caps and then incubated in the dark for 1 h at 37 °C under magnetic stirring (400 rpm). To simulate the intestinal step of the digestion, the pH of the medium was adjusted to 6.5 by adding 100 µL of 1M $NaHCO_3$ before the sequential addition of 1.26 mL of reconstituted bile extract and 3.5 mL of SIF containing 1.12 g L^{-1} pancreatin and 0.56 g L^{-1} pancreatic lipase whose pH had been previously adjusted to 6.5. These additions were performed with syringes through the septum. The vials were further incubated at 37 °C under magnetic stirring (400 rpm) for 2 hours. O_2 consumption was measured in the headspace of the tubes before sampling for measurement of the others markers of lipid oxidation. For MDA measurement, samples of the incubated media were deposited in tubes containing 40 µL of a solution of butylated-hydroxy-toluene (BHT) in ethanol (1 µg μL^{-1}). All samples were rapidly frozen and stored at -80°C until the analysis.

To assess the role of the constituents of the digestive fluids in lipid oxidation, control tubes were prepared by replacing SGF and SIF by the equivalent volumes of saline solution.

2.6. Assessment of lipid oxidation

2.6.1. O_2 consumption

O_2 concentration in the headspace of the samples was measured by gas chromatography with the method previously described (Villière *et al*., 2005; Berton *et al*., 2011). The results were means of three measurements for three digestions and expressed in µmoles of consumed O_2 per g of oil (µmol O_2 g^{-1} oil).

2.6.2. Hydroperoxides

Hydroperoxides were directly quantified in the emulsions and in the digestive media by a modified ferrous-xylenol orange (FOX) assay which avoids the lipid extraction step (Nourooz-Zadeh *et al*., 1995; Eymard et Genot, 2003). Depending on their level of oxidation, the samples were diluted 28 to 135 times in isopropanol and finally 10 times in FOX reagent

(that contained 2mM BHT). The standard curve (0-15 µM) was done with solutions of hydrogen peroxide (30% H_2O_2, Fluka) in isopropanol. Results were means of measurements performed during three independent digestions unless specified and were expressed in µmoles eq H_2O_2 g^{-1} lipids.

2.6.3. Quantification of malonaldehyde (MDA)

MDA was quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC) paired with a fluorescence detector after being extracted by trichloro-acetic acid (TCA) and reacted with thiobarbituric acid (TBA) as described previously (Kenmogne-Domguia *et al*., 2012b). Results were expressed in nmoles MDA g^{-1} lipids using the standard curve.

2.6.4. Quantification of 4-hydroxyalkenals

4-HHE and 4-HNE were analysed by GC-MS in negative chemical ionisation mode after a double derivation and quantified with internal deuterated compounds synthetized by Isabelle Jouanin (Plateforme Metatoul, Toulouse, France) as described previously (Michalski *et al*., 2008). Results were expressed in nmoles g^{-1} lipids.

2.6.5. Tocopherol analysis

Lipids were extracted from the emulsions or digestive media according the method of Bligh and Dyer (Bligh et Dyer, 1959). An aliquot of the lipid extract was dried under a flux of nitrogen and then solubilized in hexane. Tocopherol separation and quantification were performed as described previously (Awada *et al*., in press).

2.7 Statistics

All experiments were performed at least in triplicate. The results were reported as means +/- standard deviations (STD). Analysis of variance (ANOVA) and comparison of means (Neuman-Keuls test; $p<0.05$, otherwise stated) were performed with Statgraphics software package. When comparison of variance test detected no differences between samples, the results of non parametric Kruskal-Wallis test were considered.

3. Results

3.1. Lipid oxidation of the protein-stabilised emulsion during the in vitro digestion.

During the incubation of the emulsion (pH 6.5) at 37°C in the presence of 20 µM metmyoglobin a lag phase of approximately one hour was observed for the O_2 uptake, followed by a gradual increase (Fig. 1).

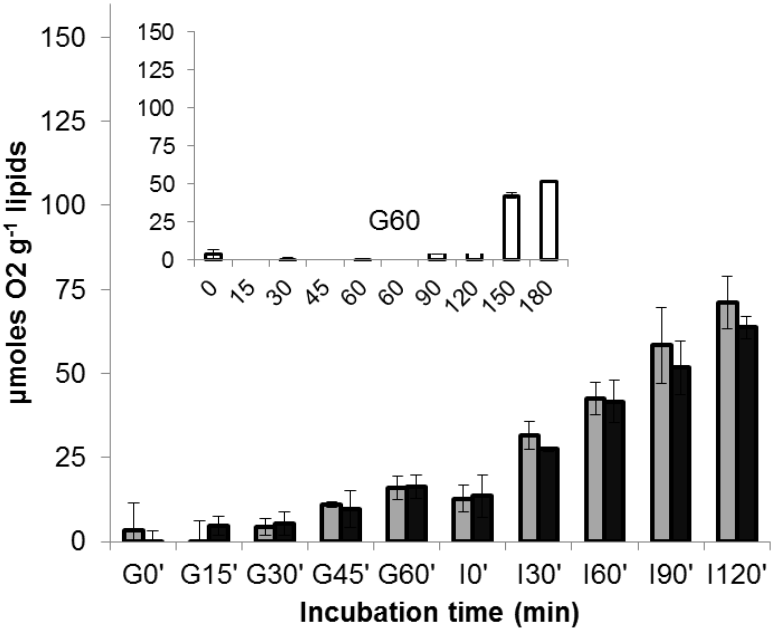


Figure 1: Oxygen consumption during the *in vitro* digestion of the BSA-stabilised emulsions. Gray bars: emulsion incubated without digestive juice (control), dark bars: emulsion incubated with digestive juice (trial). Values were means ± s.d. of three independent digestions. Insert: O_2 uptake during incubation at 37°C without pH adjustment.

After 3 hours, total duration of an *in vitro* digestion, the O_2 uptake reached 50 µmoles g^{-1} lipids. Similar results have been observed for the formation of MDA: a shorter lag phase <30 min, followed by an increase of the MDA concentration that reached more than 3 µmoles g^{-1} lipids after 3 hours of incubation (Fig. 2, insert).

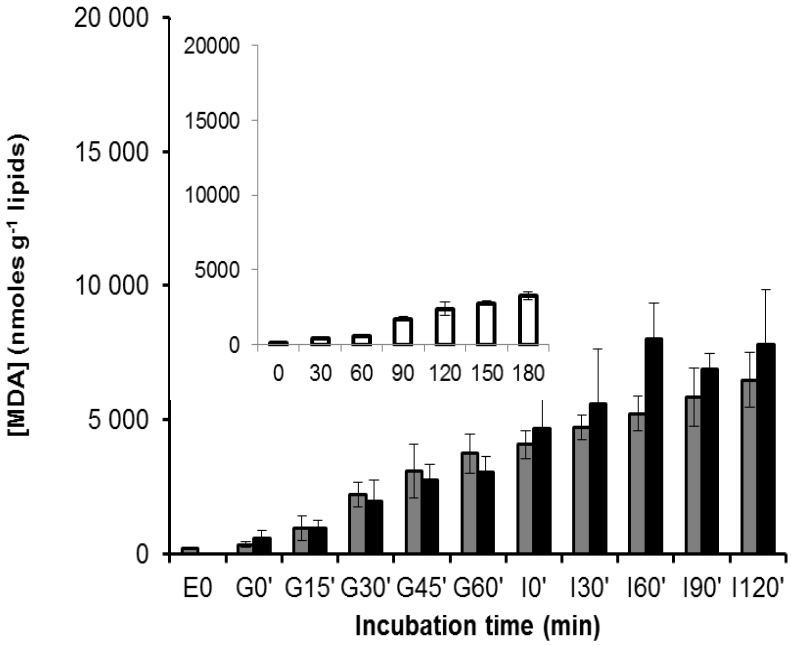


Figure 2: Formation of MDA during the *in vitro* digestion of the BSA-stabilised emulsions. Gray bars: emulsion incubated without digestive juice (control), dark bars: emulsion incubated with digestive juice (trial). Values were means ± s.d. of three independent digestions. Insert: formation of MDA during incubation at 37°C without pH adjustment.
With E0 the fresh emulsion, G for gastric media and I for intestinal media

During the *in vitro* digestion of the emulsion, O_2 consumption exhibited a different pattern (Fig. 1). Even low, it started during the gastric step and was around 16 µmoles g^{-1} lipids after 60 min. During the intestinal step, a further increase of O_2 consumption was observed and reached from 63 to 71 µmoles g^{-1} lipids after 2 hours of intestinal digestion, corresponding to a total of 3 hours of digestion. Evolution of hydroperoxides, primary products of lipid oxidation gave similar trends (results not shown). In the emulsion, the quantity of MDA was 200 ± nmoles g^{-1} lipids (Fig. 2). From the beginning of the gastric step to its end, a regular increase of MDA quantities was observed with or without the digestive juice (trial and control, respectively). Whatever the conditions, the quantities of MDA at the end of the gastric phase were close to 3 µmoles g^{-1} lipids. The formation of MDA continued during the intestinal step. The quantities of MDA reached 6.5 µmoles g^{-1} lipids in the control and 7.8 µmoles g^{-1} lipids in the trial at the end of the incubation. These quantities were approximately double when compared to that formed during the incubation of the same emulsion during 3 hours. MDA was formed through the decomposition of hydroperoxides from polyunsaturated fatty acids containing at least 3 double bounds (Esterbauer *et al.*, 1991). 4-Hydroxy-2-hexenal (4-HHE), arising from the oxidation of n-3 fatty acids, 4-hydroxy-2-nonenal arising from the oxidation of n-6 fatty acids were also quantified. The quantities of 4-HHE increased

from 29 nmoles g^{-1} lipids to 96 nmoles g^{-1} lipids during the gastric phase, and reached 231 nmoles g^{-1} lipids at the end of the intestinal phase. The quantities of 4-HNE were close to 5 nmoles g^{-1} lipids (quantification limit) at the beginning of the gastric phase and increased to 17 nmoles g^{-1} lipids within the gastric step and reached 51 nmoles g^{-1} lipids at the end of the intestinal phase. In the digestive conditions, the quantities of measured hydroxyalkenals (nmoles g^{-1}) were thus by far lower than that of MDA (µmoles g^{-1}). [MDA]/[4-HHE+ 4HNE] ranged from 16 at the beginning of the digestion to 28 at the end of the intestinal phase. As expected from the fatty acid composition of the lipid blend used to prepare the emulsion (see table 1 in additional data), the quantities of 4-HHE were higher than those of 4-HNE throughout the digestion. In fact, [4-HNE]/[4-HHE] ranged from 0.21 in the emulsion to 0.26 at the beginning of the intestinal phase and came back to 0.21 at the end of the digestion. This ratio is by far lower than the n-6/n-3 in the lipid blend (0.59). Additionally tocopherols were measured at the end of the intestinal step. Amounts detected were around the detection limit of the method demonstrating that tocopherols, whatever their molecular form were degraded during the digestion.

3.2. Lipid oxidation of the phospholipid -stabilised emulsion during in vitro digestion.

O_2 uptake during the digestion of the surfactant-stabilised emulsion remained low during the gastric step and increased sharply after 30 minutes in intestinal conditions (Fig. 3).

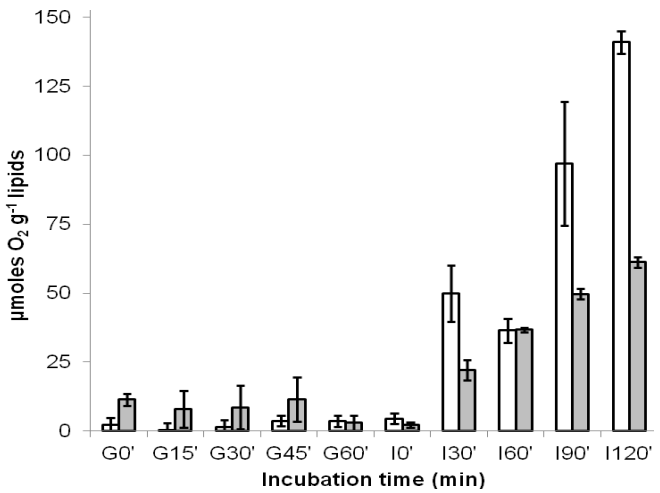


Figure 3: Oxygen consumption during the *in vitro* digestion of the phospholipid-stabilised emulsions. White bars: emulsion incubated without digestive juice (control), gray bars: emulsion incubated with digestive juice (trial). Values were means ± s.d. of three independent digestions.

Except after 60 minutes, O_2 uptake was significantly higher for the emulsion incubated without digestive juices (control). After 3 hours of digestion, it reached 150 µmoles g^{-1} lipids

in the control, whereas it levelled off at 60 µmoles g^{-1} lipids with the digestive juices, reaching a value similar to O_2 uptake measured during the digestion of the protein-stabilised emulsion. Similarly, quantities of hydroperoxides remained low during the gastric step (< 10 µmoles g^{-1} lipids). At the end of the intestinal step, 120 µmoles g^{-1} were quantified in the system without digestive juices and 60 µmoles g^{-1} lipids with the digestive juices (results not shown).

As for O_2 uptake and hydroperoxide amounts, quantities of MDA measured during the gastric step remained at very low levels (Fig. 4).

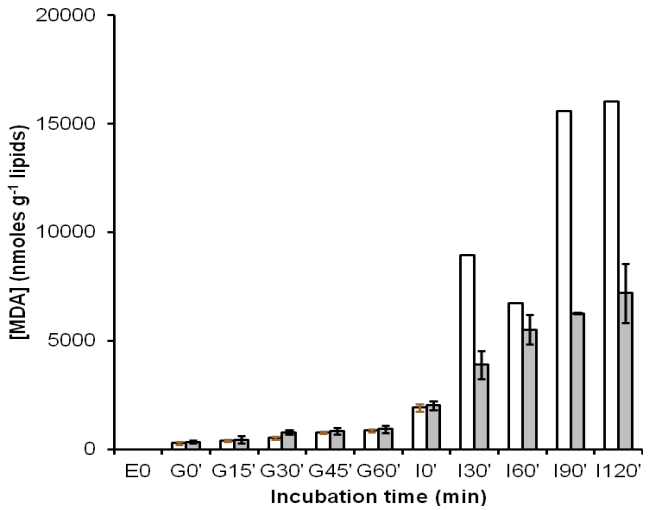


Figure 4: Formation of MDA during the *in vitro* digestion of the phospholipid-stabilised emulsions. White bars: emulsion incubated without digestive juice (control), gray bars: emulsion incubated with digestive juice (trial). Values were means ± s.d. of three independent digestions.

Furthermore, no difference was noticed between the samples incubated without or with digestive juices. The quantities of MDA started to increase tremendously at the beginning of the intestinal step. After 30 min, MDA quantities increased moderately in the presence of the digestive juice, whereas the increase was far more marked without the digestive juices, with exception of the value measured after 1 hour in intestinal conditions. At the end of the incubation, the quantities of MDA were 2 fold higher (~15.4 µmoles g^{-1} lipids) without digestive juices than with the digestive juices (~7.2 µmoles g^{-1} lipids). Up to 30 min of gastric incubation, the quantity of detected 4-HHE or 4-HNE was lower to their limit of quantification. The quantities of 4-HHE started to increase at the end of the gastric phase (61 nmoles g^{-1} lipids after 60 min) and rose 216 nmoles g^{-1} lipids at the end of the intestinal step with the digestive juices and 350 nmoles g^{-1} lipids without. The [4-HNE]/[4-HHE] was 0.33 without and 0.27 with the digestive juices, whereas n-6/n-3 was 0.59.

Tocopherols, antioxidants present initially in the lipid blend, were quantified throughout the *in vitro* digestion (Fig. 5).

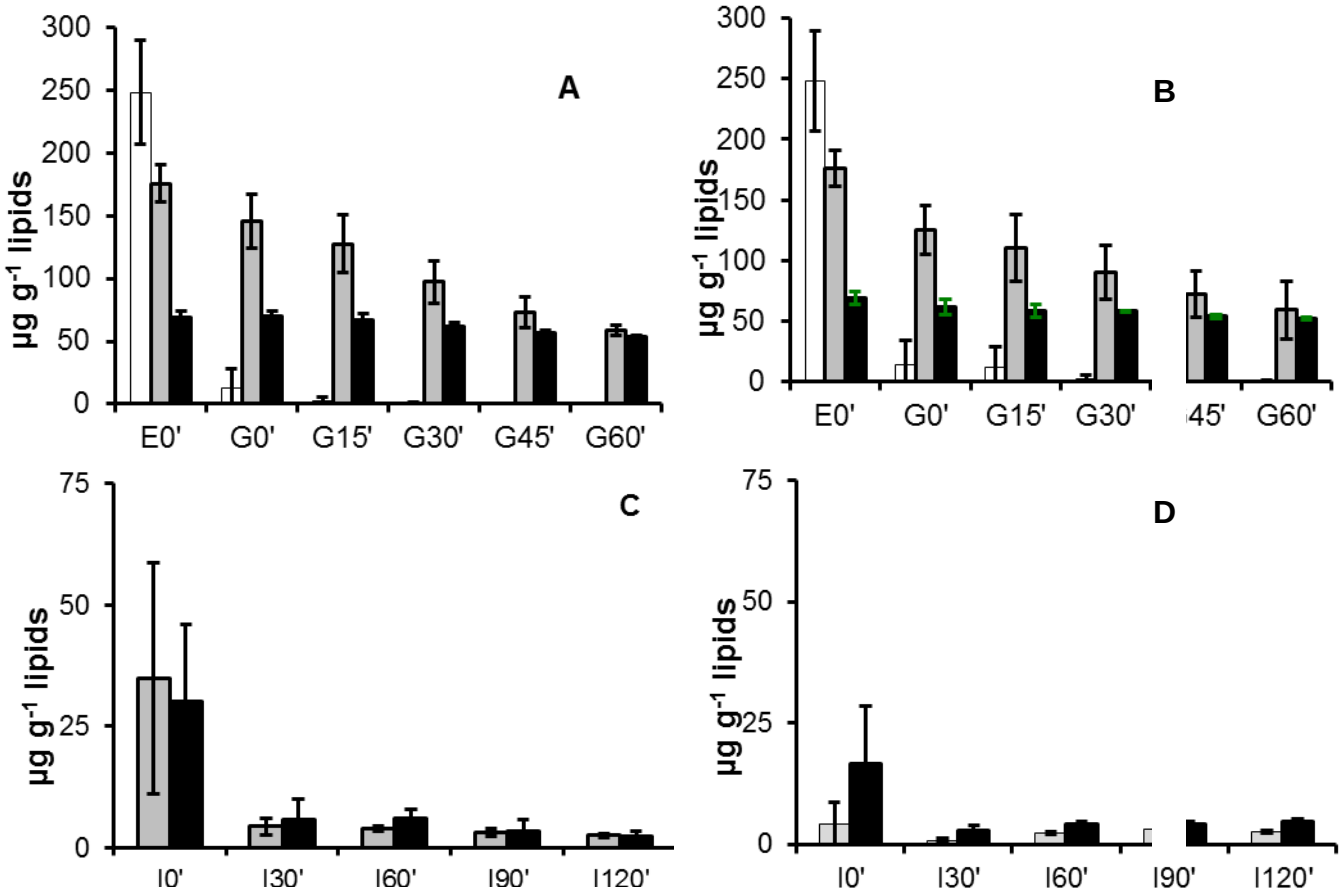


Figure 5: Fate of tocopherols during the in vitro digestion of the phospholipid-stabilised emulsions. A (without the digestive juicess) and B (with the digestive juices) during the gastric step. C (without the digestive juices) and D (with the digestive juices) during the intestinal step (n=3). White bars: α-tocopherol, gray bars: γ-tocopherol and d bars: δ-tocopherols

α-Tocopherol, the major tocol component in the lipid blend, was rapidly consumed since the earlier steps of digestion. After 30 min of incubation in the gastric conditions comprising or not the presence of SGF, no α-tocopherol was no more detected in both systems (Fig. 5 A and B). The quantities of γ-tocopherol decreased gradually during the gastric step, ~ 60 µmoles g^{-1} lipids remaining at the end of the gastric phase. On the same time, the quantities of the last isomer, δ-tocopherol, remained constant throughout the same period. A drastic reduction of the remaining quantities of γ-tocopherol occurred at the beginning of the intestinal phase. It was more pronounced when the media contained the digestive juices. A small amount of γ-tocopherol remained present during the rest of the intestinal phase (< 5 µmoles g^{-1}). The evolution of δ-tocopherol was similar with a drastic reduction at the

beginning of the intestinal phase followed by a steady state. At the end of the digestion, amounts of residual tocopherols were similar with or without digestive juices (Fig. 5 C and D). As most of the endogeneous antioxidants have been consumed after 30 min of intestinal digestion and remain steady afterward, one should conclude that the lower extent of lipid oxidation during the incubation with the intestinal juices is related to the presence of the fluid juices and the related composition of the digestive media (digested emulsion and intestinal juice).

4. Discussion

4.1. Oxidative fate during digestion: what can be related to digestion itself?

4.1.1. BSA-stabilised emulsion

During digestion, the physico-chemical environment of the oil droplets changed. The most obvious modifications of the environment concern the temperature and the pH. pH started acidic during the gastric phase and raised neutrality during the intestinal step. It is generally accepted that acidic pH favours lipid oxidation, especially in the presence of an initiator such as metmyoglobin (Kanner et Lapidot, 2001; Genot *et al*., 2003). The comparison of the kinetics of oxidation of the protein-stabilised emulsion kept at its initial pH of 6.5 during the same period of incubation to the kinetics observed in the digestive conditions or in the control performed without the digestive juices but keeping the variation of pH, confirmed this statement. The striking differences occurred during the first hour of incubation. Without pH adjustment (pH 6.5), no O_2 uptake was evidenced, even in the presence of 20 µM metmyoglobin, whereas it represented approximately 16 µmoles g^{-1} lipids with or without the gastric juices. Consequently, the development of lipid oxidation during the incubation of the BSA-stabilised emulsion in gastric conditions seems to result from the prooxidant effect of metmyoglobin at acidic pH. A mild proteolysis of metmyoglobin has been shown to enhance the prooxidative activity of the resulting species at a pH ranging from 2.2 to 4.2 (Carlsen et Skibsted, 2004). However in this work, the metmyoglobin/pepsin was 90 (w/w), whereas it was 0.23 (w/w) in the present study. It could be postulated that in gastric conditions, the excess of pepsin compared to the proteins of the bolus led to an extensive proteolysis, including that of metmyoglobin. In our *in vitro* system, the highly hydrolysed metmyoglobin would have a similar prooxidant activity compared to the intact protein as no significant differences in O_2 uptake nor in the formation of MDA have been observed with or without the digestive juice. One should underline that one main limitation of our *in vitro* model is the

lack of lipase during the gastric phase while fat digestion in human is characterised by the presence of an active gastric lipase (Hamosh, 2000; Favé *et al*., 2004). Nevertheless, two recent studies have highlighted that lipolysis during the gastric phase did not deeply affect the extent of lipid oxidation. One study was achieved in the presence of F-AP15 fungal lipase (Larsson *et al*., 2012), the other one with human gastric juice (Lorrain *et al.*, 2012).

At the beginning of the intestinal phase, the pH was adjusted to pH 6.5, which is assumed to be less prooxidant. Nevertheless, an increase of the O_2 uptake was noticed in all conditions and the differences between the three systems were reduced. For instance, in the emulsion incubated with metmyoglobin but without pH adjustment, the O_2 uptake was only 1.3 times lower than for system with pH adjustment at the same time of incubation. Comparison of oxidation in the samples incubated with or without digestive juices can provide relevant information on the possible relationship between lipolysis and oxidation. Indeed free fatty acids are claimed to be more prone to oxidation than the esterified form (Lorrain *et al*., 2012). In our experiments we observed similar O_2 uptake and quantities of MDA and 4-HHE formed during the incubation with or without intestinal juice. We can thus postulate that in the BSA-stabilised emulsion, the lipolysis of the oil droplets did not deeply impact the extent of lipid oxidation.

4.1.2. Phospholipid-stabilised emulsion

During the intestinal phase, the phospholipid-stabilised emulsion exhibited different behaviour towards oxidation as regard to the composition of the incubation medium. Except after one hour of incubation, the system without the digestive juices contained higher quantities of HPX and MDA, than the media incubated with the digestive juices. Several hypotheses can be proposed. Firstly, in the presence of the intestinal juices, the lipid hydrolysis provoked by the pancreatic lipase could have diminished lipid oxidation; this assumption would apparently contradict the previously postulated higher oxidability of free fatty acids as compared to esterified fatty acids. One however could take in mind the fact that our system is characterized by the presence of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids which revealed to be very stable toward oxidation when dispersed in aqueous systems probably due to their molecular conformation in aqueous medium (Miyashita *et al*., 1993). Hydrolysis of oils containing LC n-3 fatty acids has even been proposed as a method to produce more stable formulations. Secondly, some compounds present either in pancreatin or in the bile extract could exert a protective effect against oxidation. However, the same protective effects of the gastro-intestinal fluids were not found with the protein-stabilised

emulsions. Finally, one may assume that the effect is due to specific interactions between the lipolysis and/or lipolysis products, the initial composition of the emulsion and the intestinal juice leading to an overall decrease of markers of lipid oxidation.

At the end of the digestion, FFA accounted for 22 % of the lipids of the BSA-stabilised emulsion and ~20 % in the case of the phospholipid-stabilised emulsion. MAG represented 9 % of the lipids of the digestion BSA emulsion and 4 % in the phosoholipid-stabilised one. As in BSA-stabilised emulsion, no significant differences were observed in the extent of oxidation with or without lipolysis, it could be proposed that the extent of lipolysis *per se* doesn't directly impact lipid oxidation. Recently it was noticed that the extent of lipid oxidation measured by thiobarbituric reactive substances and HPX, during *in vitro* digestion of cod oil, increased in the presence of bile and pancreatin (Larsson *et al*., 2012) which apparently contradicts our data. However, the authors did not mention any experiment on the digestion of an emulsion with or without the digestive juices. Furthermore, the extent of lipid oxidation was higher in emulsion than in bulk and the fate of lipid during digestion depended also on the ratio between the substrate (lipids) and the digestive media (enzymes, ionic strength, bile salts…). Additionally, the potential action of bile salts upon lipid oxidation should not be omitted. The anti or pro oxidant effect of bile salts depends on the ratio between the substrate concentration (linoleate) and that of bile salts (Delange et Glazer, 1990). In model systems (phosphatidyl-choline liposomes or sodium arachidonate solution), neither taurodeoxycholate (TDC) nor taurourodeoxycholate (TUCD) possessed any effect on spontaneous lipid oxidation (Sreejayan et von Ritter, 1998). Conversely, with ferrous iron, the presence of TDC led to an increase of the rate of lipid oxidation while addition of TUDC completely abolished the pro oxidant effect of TDC. Thus TUDC was assumed not to act as an antioxidant *per se* but to be capable to prevent the pro-oxidant effect caused by others compounds such as TDC (Sreejayan et von Ritter, 1998). Up to now, we cannot favour one explanation or another to explain the lower extent of lipid oxidation during digestion in the presence of the digestive juices of the phospholipid-stabilised emulsion.

4.2. Importance of the fatty acid composition of the emulsified lipids on the oxidative fate during digestion.

We previously investigated the oxidative fate of rapeseed oil-in-water emulsion stabilised by BSA during *in vitro* digestion using the same experimental conditions (Kenmogne-Domguia *et al*., 2012b). The comparison of these results with the present study are of interest, as the only difference between both studies consisted in the presence of long chain n-3 fatty acids in

the present work, whereas rapeseed oil contained only about 10 % of 18:3 n-3. The peroxidability index based on the fatty acid composition (Meynier *et al*., 1999) is 41 for the rapeseed oil and 144 for the lipid blend containing LC n-3 (ratio of 3.5). Comparison the O_2 uptake for the emulsions prepared with both oil phases highlights that large differences during the intestinal step of the digestion. At the end of this step, O_2 uptake was 4.5 higher when emulsion contained the LC n-3 PUFA. Differences were even more pronounced on the quantities of MDA which were 20 fold higher at the beginning and 40 fold higher at the end of the gastric step in the case of emulsion containing LC n-3 PUFA. These differences were even accentuated at the end of the intestinal step (X50). As tocopherol content, emulsifier (BSA) and droplet size of both emulsions were similar, the observed difference can be attributed to the emulsified lipids themselves and especially related to their PUFA composition. To our knowledge, no direct comparison of the oxidation of lipids during *in vitro* digestion as a function of their unsaturation has already been performed. The present results suggest that the extent of lipid oxidation increases with the number of unsaturation of the fatty acids during the digestion of protein-stabilised emulsion as it is widely accepted in foods and in most chemical model systems.

4.3. The role of the interface on oxidative fate of lipids during digestion

In this work, we compared the oxidative stability of an emulsion stabilised with BSA with average droplet size of 1.7 µm and an emulsion stabilised by small-size surfactants, namely a mixture of PC and Tween 80, with droplet size of 205 nm. When the gastric juice was omitted in the incubation medium, O_2 uptake and formation of MDA were favoured in the BSA-stabilised emulsion as compared to the surfactant-stabilised one. In the same way, conjugated dienes hydroperoxides and hexanal were produced in higher amounts during the incubation of a stripped-sunflower oil stabilised by BSA at pH 4.0 and in the presence of 20 µM metmyoglobin than in an emulsion stabilised by egg lecithin (Lorrain *et al*., 2010). The incubation conditions did not include neither pepsin nor mucin.

In the presence of the digestive juices, the proteolysis of the absorbed protein led to flocculation and coalescence of the oil droplets during the gastric phase (Kenmogne-Domguia *et al*., 2012a). In contrast, no changes of the droplet sizes were noticed during the gastric digestion of the phospholipid-stabilised emulsion (data not shown).

5. Conclusion

Our results highlighted that during *in vitro* digestion, emulsified lipids oxidized in the presence of metmyoglobin not only in the gastric step, in relation with the low pH encountered in gastric medium, but also during the intestinal phase. Furthermore, the endogenous tocopherols were consumed throughout the digestion: firstly α-tocopherol during the gastric phase, then γ and δ-tocopherols during the intestinal step. In the presence of the digestive juice, the protein and phospholipid-stabilised emulsions exhibited similar extent of lipid oxidation at the end of the digestion, despite differences in their kinetics. MDA was formed in higher quantities than 4-HHE and 4-HNE during the digestion of both emulsions. Altogether, these results would suggest that both the formulation of enriched food and their fate upon digestion should be taken into account to a better evaluation and comprehension of the nutritional effects of the consumption of a diet rich in LC n-3 FA.

Acknowledgments

This work was supported by INRA and Région Pays de la Loire: PhD grant of H.B.K.-D., and by ANR (French National Research Agency) - program "Alimentation et industries alimentaires–Food and food industry": ANR-08-ALIA-002 AGEcaninox project.

Authors (AM, CG) participate to the COST action FA1005 "Improving health properties of food by sharing our knowledge on the digestive process (INFOGEST)".

Lucie Ribourg is acknowledged for her help in tocopherols quantification.

References

Armand, M., Borel, P., Pasquier, B., Dubois, C., Senft, M., Andre, M., Peyrot, J., Salducci, J., & Lairon, D. (1996). Physicochemical characteristics of emulsions during fat digestion in human, stomach and duodenum. American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology, 271, G172-G183.

Armand, M., Pasquier, B., Andre, M., Borel, P., Senft, M., Peyrot, J., Salducci, J., Portugal, H., Jaussan, V., & Lairon, D. (1999). Digestion and absorption of 2 fat emulsions with different droplet sizes in the human digestive tract. American Journal of Clinical Nutrition, 70, 1096-1106.

Awada, M., Meynier, A., Soulage, C. O., Viau, M., Ribourg, L., Hadji, L., Debard, C., Benoit, B., Géloën, A., Guichardant, M., Lagarde, M., Genot, C., & Michalski, M. C. (in press). High-fat diet enriched with n-3 LC-PUFA affects differently adiposity and inflammation when carried by phospholipides or triacylglycerols in mice. Nutrition & Metabolism.

Awada, M., Soulage, C. O., Meynier, A., Debard, C., Plaisancié, P., Benoit, B., Picard, G., Loizon, E., Chauvin, M. A., Estienne, M., Peretty, N., Guichardant, M., Lagarde, M., Genot, C., & Michalski, M. C. (2012). Dietary oxidized n-3 PUFA induce oxidative stress and inflammation: Role of intestinal absorption of 4-HHE and reactivity in intestinal cells. Journal of Lipid Research, 53, 2069-2080.

Baynes, J. W. (2007). Dietary ales are a risk to human health-not. Molecular Nutrition & Food Research, 51, 1102-1106.

Berton, C., Genot, C., & Ropers, M. H. (2011). Quantification of unadsorbed protein and surfactant emulsifiers in oil-in-water emulsions. Journal of Colloid and Interface Science, 354, 739-748.

Berton, C., Ropers, M. H., Viau, M., & Genot, C. (2011). Contribution of the interfacial layer to the protection of emulsified lipids against oxidation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, 5052-5061.

Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37, 911-917.

Carlsen, C. U., & Skibsted, L. H. (2004). Myoglobin species with enhanced prooxidative activity is formed during mild proteolysis by pepsin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 1675-1681.

Cohn, J. S. (2002). Oxidized fat in the diet, postprandial lipaemia and cardiovascular disease. Current Opinion in Lipidology, 13, 19-24.

Delange, R. J., & Glazer, A. N. (1990). Bile-acids - antioxidants or enhancers of peroxidation depending on lipid-concentration. Archives of Biochemistry and Biophysics 276, 19-25.

Dobarganes, C., & Marquez-Ruiz, G. (2003). Oxidized fats in foods. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, 6, 157-163.

EFSA. (2010). Scientific opinion on dietary reference values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids,

and cholesterol 1.Efsa panel on dietetic products, nutrition, and allergies (nda) 2. EFSA Journal 8(3) doi:10.2903/j.efsa.2010.1461.

Esterbauer, H., Schaur, R. J., & Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radical in Biology and Medicine, 11, 81-128.

Eymard, S., & Genot, C. (2003). A modified xylenol orange method to evaluate formation of lipid hydroperoxides during storage and processing of small pelagic fish. European Journal of Lipid Science and Technology, 205, 497-501.

Genot, C., Meynier, A., & Riaublanc, A. (2003). Lipid oxidation in emulsions. In A. Kamal-Eldin (Ed.), Lipid oxidation pathways, (pp. 190-244). Champaign: AOCS.

Gorelik, S., Ligumsky, M., Kohen, R., & Kanner, J. (2008). The stomach as a "bioreactor": When red meat meets red wine. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56, 5002-5007.

Grootveld, M., Atherton, M. D., Sheerin, A. N., Hawkes, J., Blake, D. R., Richens, T. E., Silwood, C. J. L., Lynch, E., & Claxson, A. W. D. (1998). In vivo absorption, metabolism, and urinary excretion of a,b-unsaturated aldehydes in experimental animals - relevance to the development of cardiovascular diseases by the dietary ingestion of thermally stressed polyunsaturate-rich culinary oils. Journal of Clinical Investigation, 101, 1210-1218.

Guichardant, M., Chantegrel, B., Deshayes, C., Doutheau, A., Molière, P., & Lagarde, M. (2004). Specific markers of lipid peroxidation issued from n-3 and n-6 fatty acids. Biochemical Society Transactions, 32, 139-140.

Halvorsen, B. L., & Blomhoff, R. (2011). Determination of lipid oxidation products in vegetable oils and marine omega-3 supplements. Food & Nutrition Research, 55 DOI: 10.3402/fnr.v55i0.5792

Kanazawa, K., & Ashida, H. (1998). Dietary hydroperoxides of linoleic acid decompose to aldehydes in stomach before being absorbed into the body. Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism, 1393, 349-361.

Kanner, J. (2007). Dietary advanced lipid oxidation endproducts are risk factors to human health. Molecular Nutrition & Food Research, 51, 1094-1101.

Kanner, J., & Lapidot, T. (2001). The stomach as a bioreactor: Dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. Free Radical in Biology and Medicine, 31, 1388-1395.

Kenmogne-Domguia, H. B., Meynier, A., Boulanger, C., & Genot, C. (2012b). Lipid oxidation in food emulsions under gastrointestinal simulated conditions: The key role of endogenous tocopherols and initiator Food Digestion.

Kenmogne-Domguia, H. B., Meynier, A., Viau, M., Llamas, G., & Genot, C. (2012a). Gastric conditions control both the evolution of the organization of protein-stabilized emulsions and the kinetic of lipolysis during in vitro digestion. Food & Function, DOI: 10.1039/c2fo30031a.

Larsson, K., Cavonius, L., Alminger, M., & Undeland, I. (2012). Oxidation of cod liver oil during gastrointestinal in vitro digestion. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60, 7556-7564.

Lorrain, B., Dangles, O., Genot, C., & Dufour, C. (2010). Chemical modeling of heme-induced lipid oxidation in gastric conditions and inhibition by dietary polyphenols. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58, 676-683.

Lorrain, B., Dangles, O., Loonis, M., Armand, M., & Dufour, C. (2012). Dietary iron-initiated lipid oxidation and its inhibition by polyphenols in gastric conditions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60, 9074-9081.

Meynier, A., Genot, C., & Gandemer, G. (1999). Oxidation of muscle phospholipids in relation to their fatty acid composition, with emphasis on volatile compounds. Journal of the Science of Food and Agriculture, 79, 797-804.

Michalski, M. C., Calzada, C., Makino, A., Michaud, S., & Guichardant, M. (2008). Oxidation products of polyunsaturated fatty acids in infant formulas compared to human milk. Molecular Nutrition and Food Research, 52, 1478-1485.

Morrison, W. R., & Smith, L. M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethyl acetals from lipids with boron-fluoride methanol. Journal of Lipid Research, 5, 600-608.

Nourooz-Zadeh, J., Tajaddini-Sarmadi, J., & Wolff, S. P. (1995). Measurement of hydroperoxides in edible oils using ferrous oxidation in xylenol orange assay. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 17-21.

Ottestad, I., Vogt, G., Retterstol, K., Myhrstad, M. C., Haugen, J.-E., Nilsson, A., Ravn-Haren, G., Nordvi, B., Bronner, K. W., Andersen, L. F., Holven, K. B., & Ulven, S. M. (2012). Oxidised fish oil does not influence established markers of oxidative stress in healthy human subjects: A randomised controlled trial. British Journal of Nutrition, 108, 315-326.

Sreejayan, N., & von Ritter, C. (1998). Effect of bile acids on lipid peroxidation: The role of iron. Free Radical Biology and Medicine, 25, 50-56.

Staprans, I., Rapp, J. H., Pan, X. M., & Feingold, K. R. (1996). Oxidized lipids in the diet are incorporated by the liver into very low density lipoprotein in rats. Journal of Lipid Research, 37, 420-430.

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

Ursini, F., Zamburlini, A., Cazzolato, G., Maiorino, M., Bon, G. B., & Sevanian, A. (1998). Postprandial plasma lipid hydroperoxides: A possible link between diet and atherosclerosis. Free Radical in Biology and Medicine, 25, 250-252.

Villière, A., Viau, M., Bronnec, I., Moreau, N., & Genot, C. (2005). Oxidative stability of bovine serum albumin and sodium caseinate-stabilized emulsions depends on metal availability. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 1514-1520.

Supplementary data

Table 1: Fatty acid composition (% w/w) and content (mg g^{-1} lipids) of the emulsions.

	BSA-stabilised emulsion (1)		Phospholipid-stabilised emulsion (2)	
Fatty acid	Content	Proportion	Content	Proportion
14:0	19.9 ± 4.9	2.3 ± 0.6	12.7 ± 0.7	1.5 ± 0.0
16:0	96.6 ± 1.9	11.2 ± 0.1	101.2 ± 3.1	12.1 ± 0.2
18:0	38.5 ± 0.9	4.5 ± 0.0	36.7 ± 1.3	4.4 ± 0.0
SAT	163.0 ± 2.4	18.9 ± 0.2	161.0 ± 5.3	19.3 ± 0.3
16:1 n-9	1.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	3.6 ± 0.2	0.4 ± 0.0
16:1 n-7	17.2± 0.6	2.0 ± 0.1	17.4 ± 0.5	2.1 ± 0.0
18:1 n-9	420.1 ± 17.3	48.6 ± 1.1	403.4 ± 10.3	48.3 ± 0.2
18:1 n-7	10.2 ± 0.0	1.2 ± 0.0		
MUFA	480.6 ± 18.8	53.3 ± 1.3	438.8 ± 11.5	52.3 ± 0.3
18:2 n-6	71.7 ± 3.1	8.3 ± 0.2	64.7 ± 0.8	7.8 ± 0.1
20:4 n-6	10.1± 0.1	1.2 ± 0.0	9.9 ± 0.2	1.2 ± 0.0
n-6	88.7 ± 6.4	10.3 ± 0.7	90.8 ± 1.2	10.8 ± 0.1
18:3 n-3	4.2 ± 2.0	0.5 ± 0.2	2.2 ± 0.1	0.3 ± 0.0
20:5 n-3	26.3 ± 0.3	3.0 ± 0.1	25.4 ± 0.5	3.0 ± 0.0
22:6 n-3	112.3 ± 0.1	13.0 ± 0.3	107.3 ± 2.7	12.9 ± 0.4
n-3	151.4 ± 2.0	17.5 ± 0.6	143.7 ± 3.4	17.3 ± 0.4
PUFA	240.0± 6.4	27.8 ± 1.1	234.5 ± 4.6	28.4 ± 0.5
n-6/n-3		0.59 ± 0.04		0.64 ± 0.01
Total	863.6 ± 20.8		834.3 ± 21.2	

(1) Based on analysis performed directly on the oil blend.

(2) Based on analysis performed on the lipids extracted from the emulsions according to Bligh and Dyer (Bligh et Dyer, 1959).

The lipid phase were methylated according to Morrison and Smith (Morrison et Smith, 1964) in the presence of heptadecanoic acid as internal standard before their analysis by gas chromatography.mean and standard deviation of triplicate analysis.

Table 2: Tocopherol content in protein- and phopholipid-stabilised emulsions (µg g^{-1} lipids)

	α-tocopherol	β-tocopherol	γ-tocopherol	δ-tocopherol	total
Protein-stabilised emulsion[)]	228.3 ± 6.3	6.7 ± 0.7	214.0 ± 1.3	84.7 ± 2.2	533.7 ± 2.5
Phospholipid-stabilised emulsion	248.5 ± 41.7	4.9 ± 0.3	175.7 ± 14.8	68.8 ± 5.7	498.0 ± 62

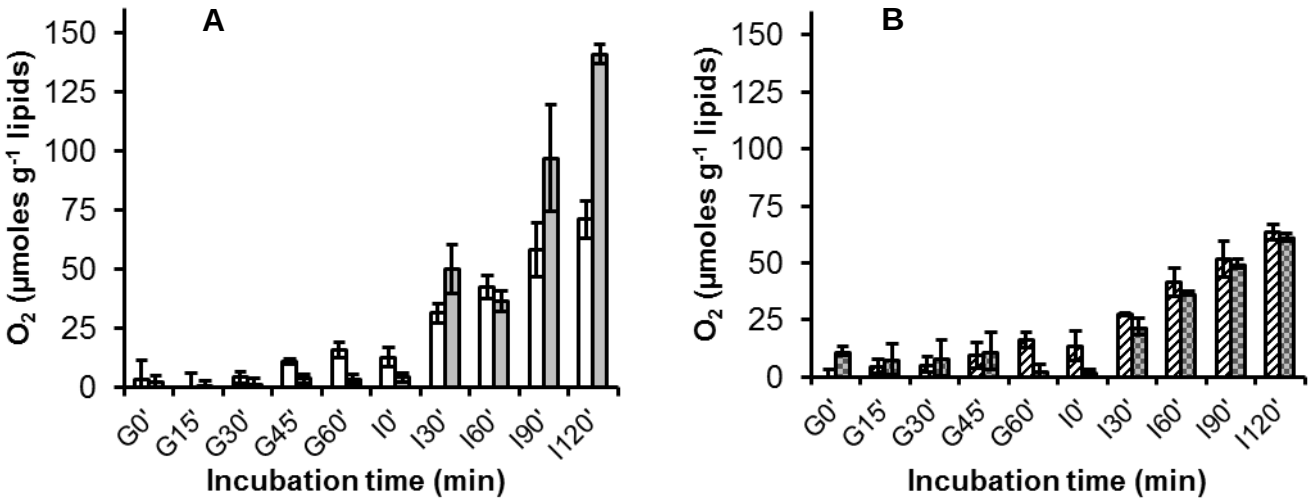


Figure 6: O_2 uptake during the digestion of the BSA(white bars) and surfactant-stabilised (graybars) emulsions. A: incubation without the digestive juices, B: incubation with the digestive juices; (n=3)

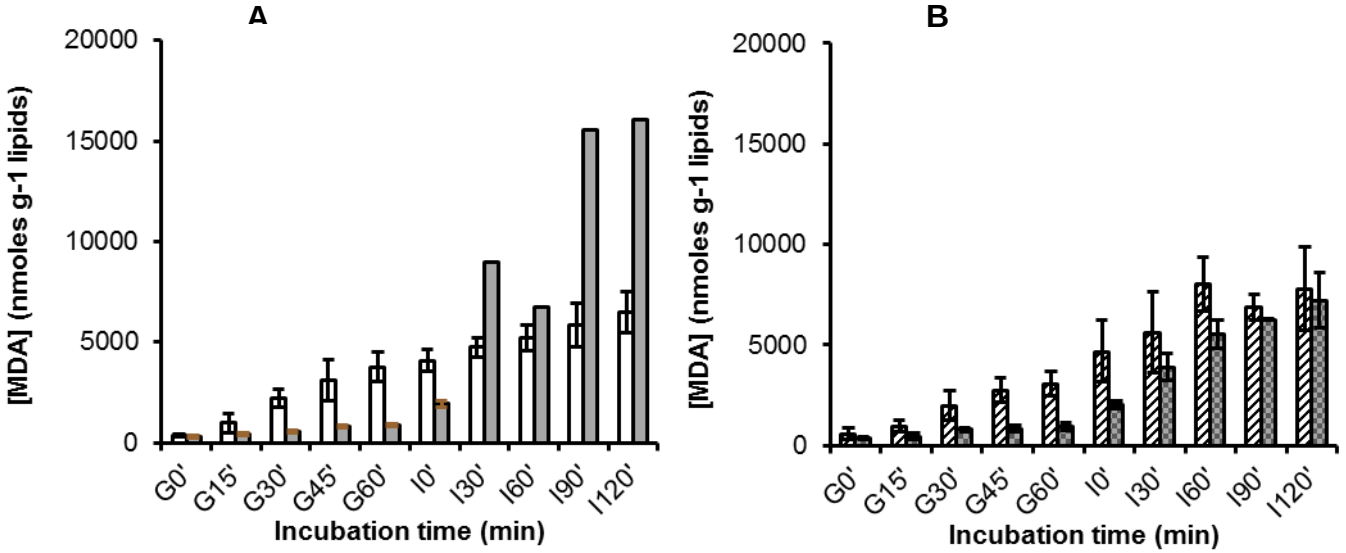


Figure 7: Evolution of MDA during the digestion of the BSA (white) and surfactant-stabilised emulsions (gray). A: incubation without the digestive juices, B: incubation with the digestive juices; (n=3)

IV-2-5- Évolution des concentrations en hydroxyalcénals

Les 4-hydroxy-alcénals sont des produits secondaires de l'oxydation des lipides. Leur dosage apporte une information supplémentaire car il permet de s'intéresser spécifiquement à l'oxydation des n-3 et des n-6. Pour rappel, le 4-HHE (4-hydroxy-2-hexénal) est issu des AGPI n-3 tandis que le 4-HNE (4-hydroxy-2-nonénal) provient des AGPI n-6. La figure 36 montre séparément l'évolution de chacun de ces produits secondaires lors de la digestion de l'émulsion stabilisée par le mélange PC/Tween 80.

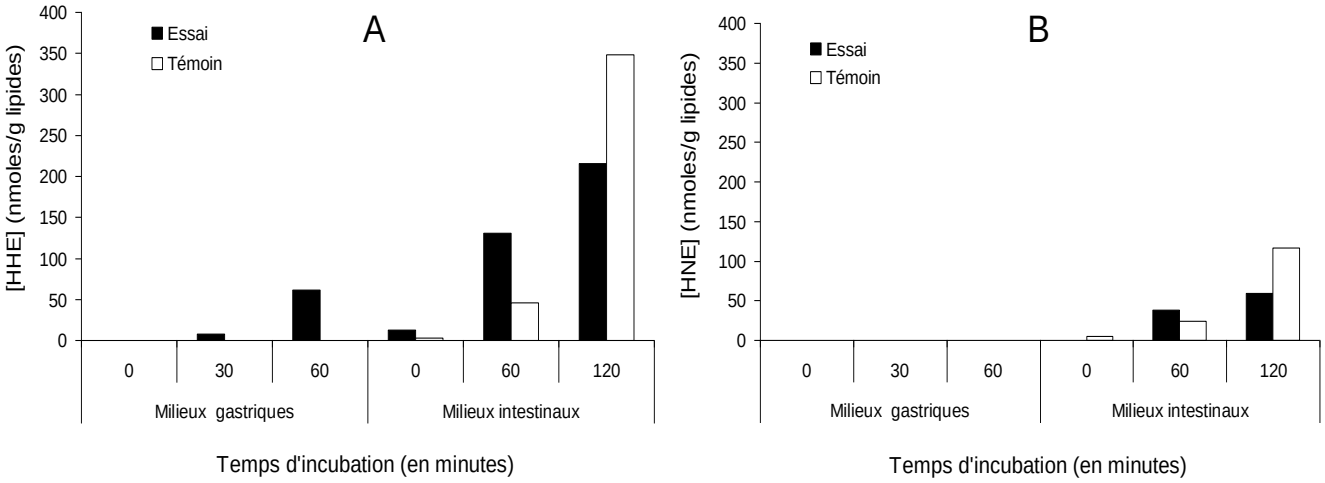


Figure 36 : Évolution de la concentration en 4-hydroxy-2-hexénal (A) et en 4-hydroxy-2-nonénal (B) au cours de la digestion de l'émulsion PC-Tween80 en présence de myoglobine 20 µM et en présence (barres noires) ou en absence (barres blanches) de sucs digestifs (n = 1 digestion)

Quel que soit le milieu et le temps d'incubation considéré, la quantité de 4-HHE formé est toujours plus importante que celle de 4-HNE. Ceci est en accord avec la composition en acide gras de l'émulsion qui contient plus d'AGPI n-3 (16,6%) que d'AGPI n-6 (10,7%). Cependant, les proportions relatives de 4-HHE et de 4-HNE ne reflètent pas celles des n-3 et des n-6 respectivement. En effet, l'émulsion contient environ 1,5 fois plus de n-3 que de n-6 tandis que l'on retrouve environ 2,5 à 3,5 fois plus de 4-HHE que de 4-HNE dans les milieux témoins et essais respectivement. Néanmoins ceci peut s'expliquer par une différence de réactivité des acides gras qui contiennent 5 ou 6 doubles liaisons dans le cas des n-3, contre 4 au maximum pour les n-6.

La formation de 4-HHE et de 4-HNE commence dans la première heure de la phase intestinale dans les deux systèmes (« témoin » et « essai »). Il faut toutefois préciser que l'analyse n'a pu être effectuée que sur une seule des 3 cinétiques. C'est pourquoi la valeur de

la concentration en 4-HHE qui semble haute après une heure d'incubation gastrique est à considérer avec précaution. De plus, comme le dosage des hydroxy-alcénals n'a pu être réalisé sur les milieux intestinaux qu'après 30 min d'incubation, il est difficile de savoir si l'évolution de leur concentration suit la même allure que les autres marqueurs d'oxydation.

IV-2-6- Possibles conséquences nutritionnelles de l'oxydation des lipides *in vitro*

Théoriquement, l'oxydation des lipides, impliquant la réaction des AGPI peut conduire à une diminution de la valeur nutritionnelle des aliments, due à la perte de ces mêmes AGPI liée à l'oxydation. Dans des études effectuées sur des aliments fréquemment consommés ou sur des aliments modèle du type émulsion, la diminution de la quantité d'AGI n'est, en général, pas observée malgré l'apparition de quantités, parfois relativement importantes, de produits issus de leur oxydation. Ceci s'explique généralement par les rapports molaires très faibles entre les quantités de produits d'oxydation formés lors de ces études et les quantités d'AGI présent dans les systèmes d'études, ce qui rend peu perceptible les pertes de ces derniers. A titre indicatif, en fin de phase intestinale pour l'émulsion riche en AGPI LC et stabilisé par les tensioactifs, les teneurs des marqueurs par gramme de lipide et par mole d'AG totaux, ainsi que le rapport molaire AG/marqueur d'oxydation sont présentés dans le tableau XI.

Tableau XI : Teneurs en marqueurs d'oxydation dans les milieux digestifs et rapports molaires des AG présents dans l'huile émulsifiée pour les émulsions stabilisées par les tensioactifs (Tween 80/PC)

	HPX	MDA	HHE	HNE
$n_{marqueurs}/g_{\ lipides}$	90.10^{-6}	8.10^{-6}	241.10^{-9}	53.10^{-9}
$n_{marqueurs}/n_{d'AG}$	94.10^{-6}	$7{,}8.10^{-6}$	231.10^{-9}	51.10^{-9}
$n_{d'AG}/\ n_{marqueurs}$	10 639	122 759	4 145 108	18 774 902

Pour évaluer l'impact nutritionnel de la digestion *in vitro,* les compositions en acides gras de l'émulsion et en fin de phase intestinale ont été déterminées et sont présentées dans la figure ci-dessous.

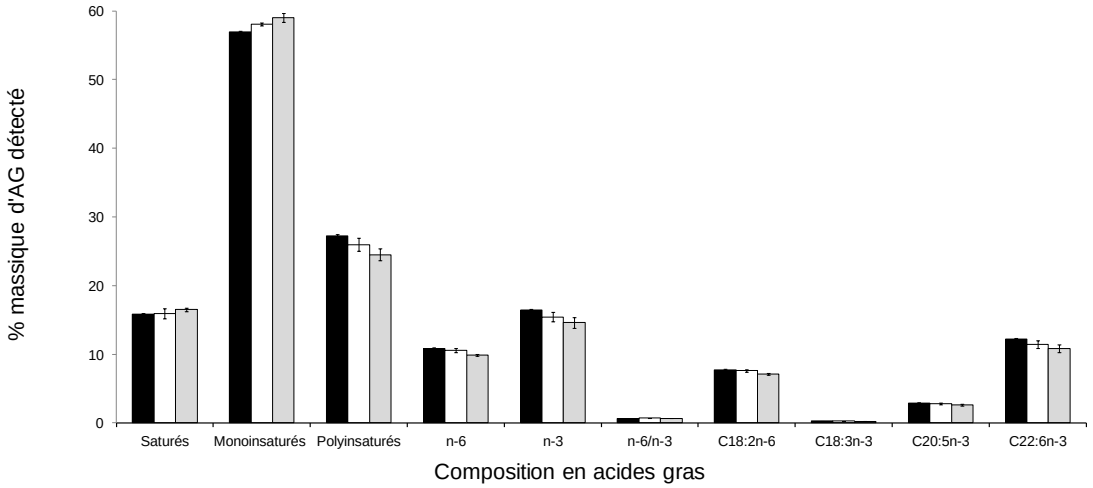


Figure 37 : Composition en acides gras de l'émulsion « n-3_LC-Tween80-PC » (barres noires) et des milieux « essais » (barres blanches) et « témoins » (barres grises) au cours de sa digestion en présence de 20 µM de myoglobine. Les barres d'erreur représentent l'écart-type des 3 cinétiques indépendantes.

Les résultats montrent qu'en comparaison avec la composition en AG de l'émulsion initiale, une légère augmentation de la proportion en acides gras saturés et monoinsaturés dans les milieux essais, augmentation qui est un peu plus importante pour les milieux témoins. Parallèlement, la proportion des AGPI présents dans les milieux évolue de manière opposée. Ainsi, la proportion d'AGPI diminue légèrement dans les milieux « essais » et façon un peu plus importante pour les milieux « témoins ». Pour savoir si ces modifications étaient liées à des pertes spécifiques en certains acides gras, les évolutions des résultats exprimés en mg AG g^{-1} lipides ont également été prises en compte (Fig. 38). Les résultats montrent une diminution significative des quantités d'AGPI présents en dans les milieux en fin de phase intestinale (deux heures). De plus, ces diminutions ne semblent pas affecter de manière similaire, les acides gras des séries n-6 et n-3. Les pertes les plus notables concernent les AGPI de la série n-3 et en particulier le DHA (de l'orde de 12%).

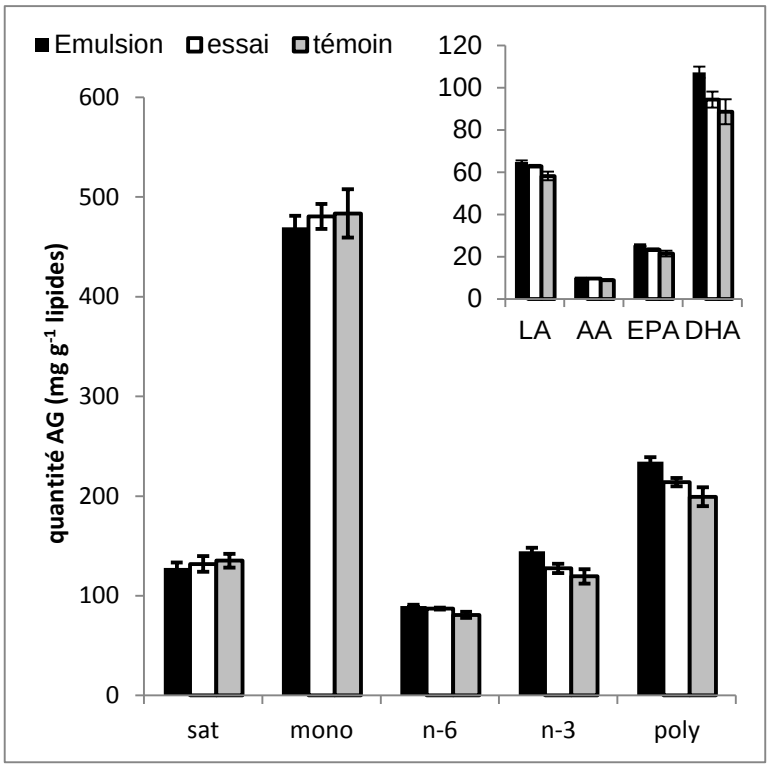


Figure 38 : Evolution des quantités d'acides gras au cours de la digestion *in vitro* des emulsions AGPI-LC stabilisées par la PC (Tween 80) en acides gras de l'émulsion « n-3_LC-Tween80-PC » (barres noires) et des milieux « essais » (barres blanches) et « témoins » (barres grises) au cours de sa digestion en présence de 20 µM de myoglobine. Les barres d'erreur représentent l'écart-type des 3 cinétiques indépendantes.

En plus de ces pertes en AGPI-LC et en particulier des plus sensibles à l'oxydation comme le DHA, il est important de rappeller que lors des digestions in vitro de ces émulsions, une disparition totale de l'α-tocophérol a été observée lors de la phase gastrique et une perte très importante en δ et γ-tocophérol au cours de la phase intestinale.

IV-3- ÉTUDE *IN VIVO* CHEZ LA SOURIS APRÈS GAVAGE AVEC UNE ÉMULSION MODÈLE

Des expérimentations animales chez la souris ont été effectuées pour savoir si les effets observés lors de la digestion *in vitro* de l'émulsion contenant des AGPI LC et stabilisée par la SAB (cf article 4) l'étaient également chez la souris après gavage avec cette même émulsion en présence ou non de metmyoglobine. Les marqueurs suivants de l'oxydation des lipides: MDA, 4-HHE et 4-HNE ont été quantifiés sur des prélèvements des contenus gastriques et intestinaux et enfin sur le plasma des souris. Les effets sur les marqueurs plasmatiques ont été comparés avec ceux observés lors d'expérimentations à long terme chez

la souris avec des aliments contenant ou non des lipides oxydés, ou lors du gavage des souris avec le 4-HHE (Awada *et al.*, 2012).

IV-3-1- Niveau des marqueurs à jeûn dans les compartiments

Afin d'avoir une idée de la variabilité inter-individuelle des souris, les concentrations molaires des HAs dans les milieux gastriques et intestinaux et dans les plasmas ont été représentées individuellement pour les souris à jeûn (Fig. 39).

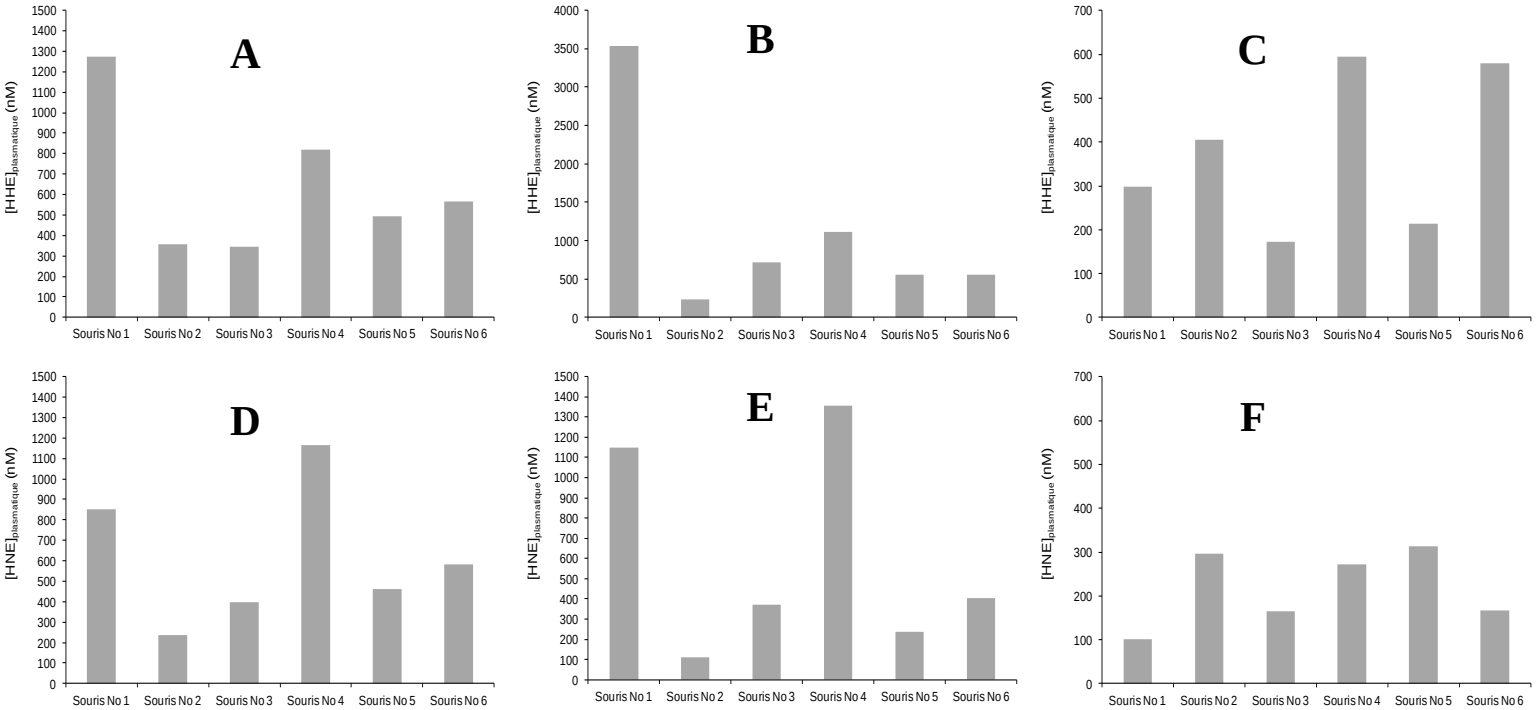


Figure 39 : Concentrations de 4-HHE (ligne 1) et de 4-HNE (ligne 2) présents dans les contenus stomacaux (A) et intestinaux (B) et dans les plasmas (C) chez les souris à jeûn.

Il ressort de cette figure que la variabilité inter-individuelle des souris est très importante et que des quantités généralement non négligeables sont détectées dans les milieux digestifs des animaux à jeûn, contrairement à ce qui pouvait être attendu. Les valeurs plasmatiques obtenues ici sont au moins en moyenne 10 et 20 fois, respectivement pour le 4-HHE et le 4-HNE, supérieures aux valeurs obtenues par Awada *et al.* (2012).

IV-3-2- Évolution des marqueurs des produits secondaires de l'oxydation des lipides dans les contenus gastriques

A cause de contrainte expérimentale, le gavage avec l'émulsion a été fait avec une émulsion contenant initialement 27,2 ± 2,7 µM de MDA alors que le gavage en présence de metmyoglobine s'est fait avec une émulsion contenant initialement 96,5 ± 4,6 µM de MDA. La figure 40 présente les concentrations en MDA et en HAs des contenus gastriques des souris collectés après leur gavage avec l'émulsion. Les résultats sont présentés en µM et en nM respectivement pour le MDA et les HAs.

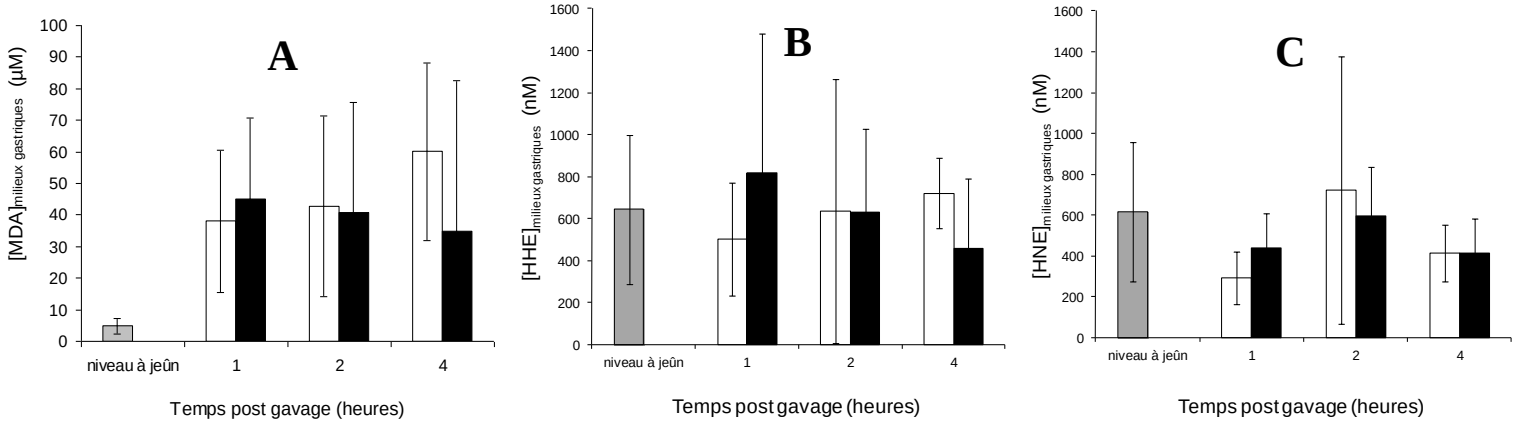


Figure 40 : Concentrations de MDA (A), 4-HHE (B) et 4-HNE (C) présents dans le contenu stomacal à jeûn (gris) ou dans les milieux gastriques après gavage des souris avec une émulsion contenant des AGPI LC et stabilisée par la SAB (barres blanches) ou avec la même émulsion additionnée metmyoglobine (barres noires). Les barres d'erreurs représentent les écart-types (n= 6).

D'une manière générale, une grande variabilité des résultats a été observée. Cette variabilité est probablement largement liée aux difficultés rencontrées du fait des faibles volumes des contenus digestifs, mais aussi de la présence de litière dans ces prélèvements, rendant encore plus problématique les analyses et leur interprétation au niveau quantitatif. De plus, la variabilité interindividuelle appréciée à la figure 39 ne peut pas être exclue.

Les concentrations de MDA dans les milieux gastriques prélevés après gavage sont supérieures à celles mesurées dans les milieux prélevés après gavage prélevés à jeûn (Fig. 40). La présence de metmyoglobine lors du gavage des souris avec l'émulsion ne provoque pas d'augmentation significative des concentrations de MDA par rapport aux concentrations mesurées lorsque le gavage est réalisé avec l'émulsion seule, et ce quel que soit le temps du prélèvement *post*-gavage. Il semblerait donc que le gavage des souris avec l'émulsion en présence ou non de metmyoglobine ne modifie pas notablement les concentrations de MDA détectées dans les contenus gastriques.

En comparant ces concentrations à celles obtenues *in vitro* dans les milieux avec la même émulsion diluée 3 fois (pH ≈ 6,4) conservée à 37°C en présence de metmyoglobine (valeurs comprises entre 116 ± 41 µM après 30 min d'incubation gastrique et 253 ± 77 µM en fin de phase intestinale), on peut noter que les concentrations obtenues *in vivo* sont au moins en moyenne 3 fois plus faibles.

Les concentrations de 4-HHE et de 4-HNE (Fig. 38 B et C) détectées après gavage quant à elles ne diffèrent pas de celles mesurées dans les milieux à jeûn. Comparées aux concentrations obtenues *in vitro*, les concentrations en 4-HHE et 4-HNE sont 7 et 1,8 fois plus faibles respectivement. De plus aucune augmentation significative n'est observée lorsque les animaux sont gavés avec de l'émulsion et de la metmyoglobine. Contrairement au protocole *in vitro* où les concentrations de 4-HHE (5635 ± 191 à 7227 ± 1078 nM) étaient, en accord avec la composition de l'huile en AGPI n-3 et n-6, au moins 3 fois supérieures à celle du 4-HNE (1013 ± 77 à 1583 ± 181 nM), chez la souris les concentrations de ces marqueurs spécifiques de l'oxydation des familles d'AGPI n-3 et n-6 respectivement ne sont pas différentes. L'absence d'effet noté au cours de l'expérimentation chez la souris pourrait s'expliquer par les réactivités plus importantes du 4-HHE et du 4-HNE, comparées au MDA. Les hydroxyalcénals se fixeraient très rapidement à la muqueuse digestive après formation. Cette hypothèse sera vérifiée après dosage des adduits d'hydroxyalcénals sur le tissu intestinal des souris prélevé au cours de l'expérimentation. Il est possible de noter que les concentrations dans les échantillons prélevés après une heure semblent être légèrement plus élevées en présence de metmyobglobine qu'en son absence. En comparant ces concentrations à celles obtenues *in vitro* dans les milieux avec une émulsion similaire (valeurs comprises entre 5635 nM après 60 min d'incubation et 7227 nM en fin de phase intestinale), on peut noter que les concentrations obtenues *in vivo* sont, comme pour celles de MDA, au moins 5 fois plus faibles.

L'absence d'effet initiateur de la MetMb, lors de la phase gastrique, peut être due aux faibles quantités de lipides mises en œuvre dans l'expérimentation chez la souris qui, avec la présence de contaminant (fragments de litière) dans les milieux digestifs a rendu nécessaire un prétraitement des échantillons conduisant à leur dilution. Ce prétraitement, ainsi que la présence de particules de litière, a pu réduire les quantités des marqueurs d'oxydation dans les milieux, rendant difficile les quantifications ultérieures.

Lors des expérimentations *in vitro*, nous avons observé que la présence de myoglobine dans les milieux digestifs conduisait à une oxydation très importante comparée à celle obtenue en son absence. Au cours de l'expérimentation chez la souris, cet effet n'a pas

pu être mis en évidence dans les milieux digestifs. Le choix du mode d'expression des résultats utilisé pour cette partie (en molaire dans le milieux hydro-alcoolique de pré-traitement des échantillons contrairement aux nmoles g^{-1} lipides utilisés dans l'expérimentation *in vitro*) a été imposé par l'incapacité de déterminer la teneur en lipides des milieux digestifs liés aux quantités de milieux collectés, trop faibles (de 20 à 617 mg par échantillon contenant des quantités variables de litière) pour permettre l'extraction et la quantification des lipides en plus des dosages de marqueurs de l'oxydation réalisés.

IV-3-2- Évolution des marqueurs des produits secondaires de l'oxydation des lipides dans contenus intestinaux

Les concentrations de MDA, 4-HHE et 4-HNE dans les échantillons collectés dans les milieux intestinaux des souris sont présentées sur la figure 41.

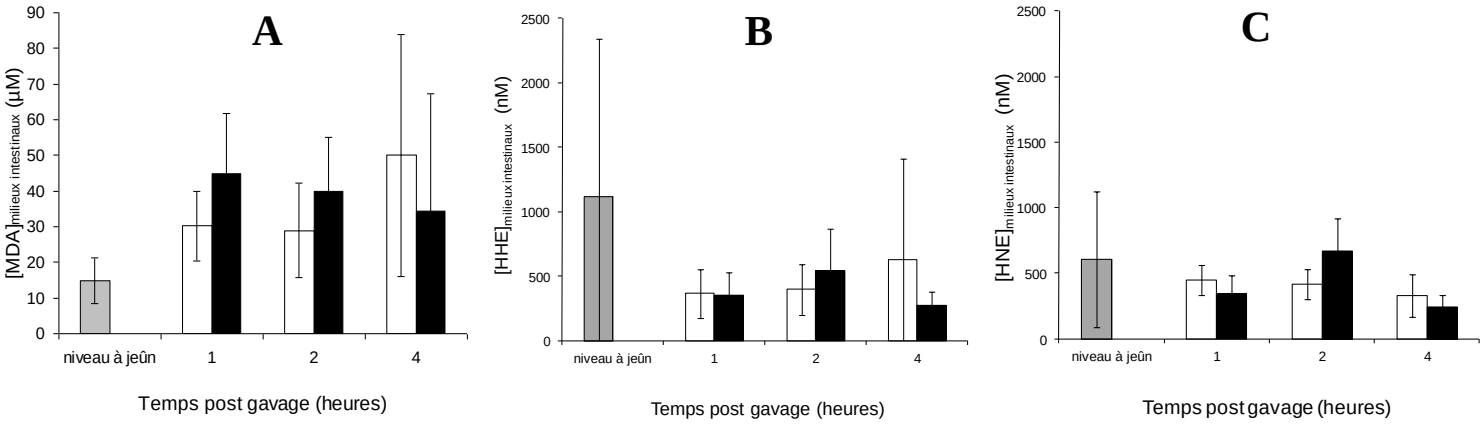


Figure 41 : Quantités de MDA (A), 4-HHE (B) et 4-HNE (C) dans les contenus intestinaux des souris à jeûn (barres grises) ou après gavage avec l'émulsion en absence (barres blanches) ou non (barres noires) de metmyoglobine. (n = 6 prélèvements indépendants).

Comme ce qui a été observé pour les contenus gastriques, la variabilité des résultats obtenus est importante. Il est néanmoins observé une augmentation des concentrations de MDA dans le contenu intestinal des souris après gavage par rapport aux contenus à jeûn, tandis que les concentrations en hydroxyalcénals restent similaires, voire même plus faibles que celles mesurées à jeûn. Cette absence d'augmentation des HAs pourrait s'expliquer par leur plus grande réactivité vis-à-vis des molécules nucléophiles. Ils se fixeraient de ce fait rapidement après leur formation aux molécules biologiques présentes dans les milieux digestifs et/ou sur les muqueuses du TGI. Cette hypothèse pourrait être facilement vérifiée en dosant les adduits d'HAs dans les tissus gastriques et intestinaux. Les concentrations

mesurées en présence de metmyoglobine tendent à être légèrement supérieures à celles mesurées en son absence, en particulier 2 heures après le gavage, tandis que la tendance inverse est notée 4 heures post-gavage. Toutefois, comme pour les milieux gastriques, les analyses statistiques ne montrent aucune différence entre les valeurs.

Il ressort de l'étude de l'oxydation dans les contenus gastriques et intestinaux des souris que ce modèle animal, ainsi que les conditions de mise à jeun ne sont pas adaptés pour cette étude. En effet, du fait de la petite taille de ce modèle, les quantités mises en œuvre pour le gavage (< 500 µL) ainsi que celles des prélèvements ne sont assez importantes pour permettre de mettre en œuvre une stratégie analytique avec les méthodes utilisées actuellement. La mise à jeun des souris sur une litière qu'elles sont susceptibles d'ingérer constitue également un frein méthodologique non négligeable, car le tissus végétal constitutif de la litière pourrait contenir des anti-oxydants (phénoliques) qui modifieraient l'oxydation. L'utilisation de modèle de rongeur plus grand soumis à un jeûn réel permettrait ainsi d'évaluer les quantités réelles des milieux digestifs et d'exprimer les résultats en fonction des quantités de lipides dans les échantillons, ce qui augmenterait la précision des résultats et permettrait une meilleure comparaison des donnés *in vivo* (dont les dilutions par les sucs digestifs ne sont pas maitrisées) avec les données *in vitro*. L'une des autres difficultés rencontrées est le manque de recul par rapport au niveau de base de ces marqueurs dans les contenus digestifs, ainsi qu'à la gamme de variation attendue, en conditions postprandiales « physiologiques » ou « pathologiques ». Malgré ces restrictions, cette expérimentation peut être considérée comme une étude de faisabilité pour des expérimentations futures.

IV-3-3- Évolution des marqueurs des produits secondaires de l'oxydation des lipides dans le plasma

Des travaux dans la littérature montrent que les produits secondaires de l'oxydation des lipides peuvent être absorbés dans l'intestin grêle (Oarada *et al.*, 1986 ; Grootveld *et al.*, 1998 ; Awada *et al.*, 2012). C'est pourquoi, ces mêmes marqueurs ont été également dosés dans le plasma. La figure 42 présente les concentrations de MDA et d'HAs dans les plasmas des souris collectés après leur gavage avec l'émulsion mélangée ou non à de la myoglobine.

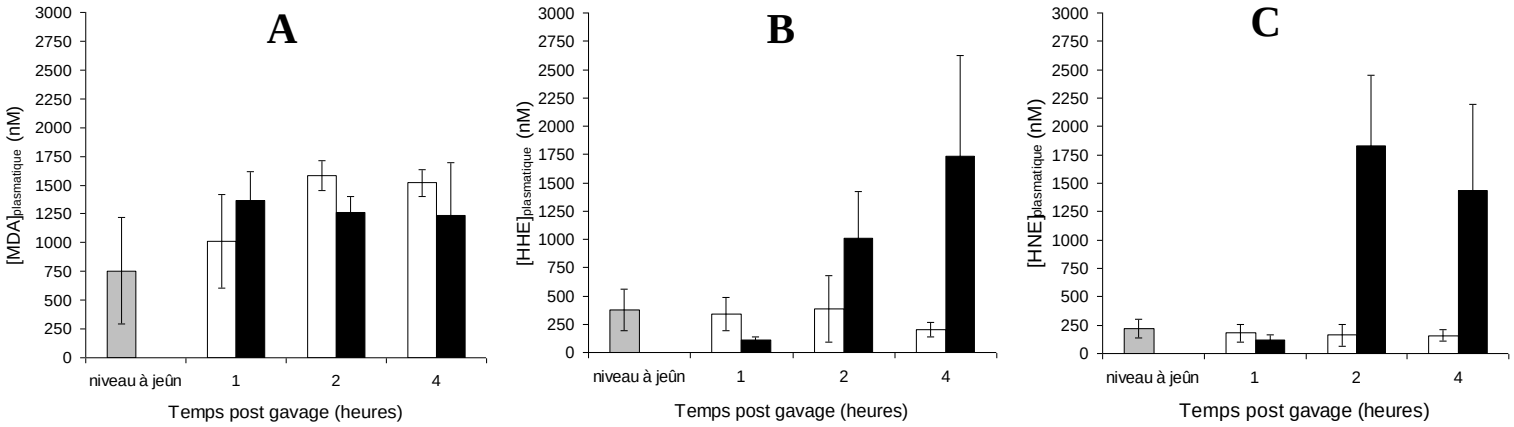


Figure 42 : Concentrations (nM) de MDA (A), 4-HHE (B) et 4-HNE (C) dans les plasmas des souris à jeûn (barres grises) et après gavage avec l'émulsion en absence (barres blanches) ou en présence (barres noires) de metmyoglobine 20 µM. (n = 6 : 6 souris par mesure).

La figure 42 montre que, comparée au plasma de souris à jeun, après gavage des souris avec l'émulsion en présence ou en absence de metmyoglobine, la concentration de MDA dans le plasma est plus élevée après une heure de digestion. Elle le reste à quatre heures de digestion. A une heure de digestion, la concentration de MDA dans le plasma des souris gavées avec l'émulsion et de la metmyoglobine tend à être légèrement plus importante que celle mesurée pour les souris gavées avec l'émulsion sans ajout de metmyoglobine. A deux heures de digestion, la tendance est inversée : la concentration de MDA plasmatique est légèrement inférieure pour les souris gavées avec la metmyoglobine. Ces résultats laissent supposer, comme ceux obtenus avec les milieux digestifs, que la présence de metmyoglobine dans l'émulsion de gavage n'a pas eu d'effet notable sur les concentrations plasmatiques en MDA.

Des différences plus marquées sont observées pour des produits spécifiques de l'oxydation des AGPI des familles n-3 et n-6, que sont le 4-HHE ou le 4-HNE. Une heure après gavage, les concentrations plasmatiques en HAs ne sont pas différentes de celles des souris à jeun. Par contre, à partir de 2 heures après gavage, correspondant au temps pour lequel la concentration plasmatique maximale était obtenue après administration orale chez des souris de quantité connue de 4-HHE, ces concentrations sont significativement plus élevées (Awada *et al.*, 2012). Elles augmentent pour le 4-HHE jusqu'à 4 heures post gavage alors que celles du 4-HNE, en accord avec les travaux de ces auteurs, semblent atteindre un plateau 2 heures après le gavage. De plus, une augmentation significativement des concentrations de ces deux marqueurs est observée après le gavage en présence de metmyoglobine. L'autre résultat surprenant est le niveau comparable des concentrations de 4-

HHE et de 4-HNE, contrairement à ce qui est observé à la fois lors de la digestion *in vitro* et lors de des études *in vivo* (Awada *et al.*, 2012). Cette similarité des concentrations en 4-HNE et en 4-HNE est surtout observée en présence de metmyoglobine. Pour mieux comprendre ce phénomène, il peut être envisagé de faire une étude similaire sur les marqueurs plasmatiques après gavage de souris avec de la metmyoglobine.

De manière très étonnante, les résultats semblent en totale contradiction avec l'hypothèse formulée pour les milieux digestifs, de la réactivité élevée des HAs par rapport au MDA. En effet, selon cette hypothèse, et en supposant que ces marqueurs étaient absorbés avec la même efficacité au niveau intestinal (absorption estimée entre 0,1 et 1 % de la fraction présente dans l'intestin : Awada *et al.*, 2012), on s'attendait à retrouver dans le plasma, des rapports entre MDA et HAs similaires à ceux observés dans les systèmes *in vitro*. Cependant, en présence de metmyoglobine, les concentrations d'HAs mesurées à partir de 2 heures post gavage sont identiques, voir supérieures, aux quantités de MDA mesurées. De plus les quantités de 4-HHE et de 4-HNE sont similaires dans le plasma de souris alors qu'au cours de la digestion *in vitro,* en accord avec la composition relative de l'huile en AGI n-3 *vs* n-6, le 4-HHE était retrouvé en quantité significativement plus importante. Ceci peut laisser supposer que les AGPI ou les produits (primaires et/ou secondaires) d'oxydation absorbés pourrait induire un stress oxydant dans le plasma conduisant à une production plasmatique de 4-HNE.

Une étude récente (Awada *et al.*, 2012) a étudié les effets chroniques de consommation d'aliments faiblement oxydés et les effet aigus d'un gavage unique avec du 4-HHE sur les concentrations plasmatiques de souris mâles C57BL. Après une alimentation sur 8 semaines avec des croquettes contenant des AGPI LC n-3 faiblement oxydés, les concentrations plasmatiques de 4-HHE étaient de 427 à 508 nM. Dans ces conditions, les concentrations en 4-HNE étaient bien plus faibles (6 à 9 nM). Dans notre étude, en présence de metmyoglobine, les concentrations plasmatiques obtenues sont, 2 et 4h après gavage, comprises entre 1000 et 1750 nM pour le 4-HHE ou le 4-HNE, représentant plus de 2 à 3 fois et 111 fois respectivement les concentrations de 4-HHE et de 4-HNE obtenues par ces auteurs. Il est à noter que les valeurs à jeun de HAs dans le plasma des souris utilisées ici (mâles CDI SWISS ; 5 mois, 47 g) sont bien plus élevées (4-HHE : 378 ± 181 nM et 4-HNE : 220 ± 86 nM) que celles rapportées à jeun par Awada et ses collaborateurs chez des souris mâles C57BL (8 semaines, 20 g) qui étaient de 25 nM et 9 nM respectivement pour le 4-HHE et le 4-HNE. Cette différence pourrait s'expliquer par la différence d'âge des souris utilisée dans ces deux études.

V- DISCUSSION GÉNÉRALE

1. Taille et organisation des gouttelettes lipidiques au cours de la phase gastrique de la digestion

De nombreuses études ont montré que les lipides émulsifiés subissaient au cours de la digestion une modification de la taille et de l'organisation de leurs structures. C'est ainsi que Armand et ses collaborateurs ont observé chez l'Homme que, une heure après ingestion d'un aliment liquide (mélange huile + œuf + saccharose), la proportion de particules comprises entre 1 et 10 µm augmentait significativement de 44 % (Armand *et al.*, 1996) et que le diamètre des gouttelettes d'émulsions fines (0,7 µm) augmentait après un séjour gastrique de 4 heures (Armand *et al.*, 1999). Les mécanismes mis en cause dans cette évolution ont été identifiés comme étant la floculation et/ou de coalescence (Beysseriat *et al.*, 2006 ; Hur *et al.*, 2009 ; Sarkar *et al.*, 2010a ; Sarkar *et al.*, 2010b ; Golding *et al.*, 2011 ; Malaki Nik *et al.*, 2011 ; Li *et al.*, 2012). Dans la présente étude, l'effet des conditions digestives sur les mécanismes d'évolution de la taille des particules a été évalué pour des émulsions stabilisées par une protéine ou par des tensioactifs. Ces conditions, en fonction de la nature des émulsifiants présents à l'interface, ont des effets différents.

Il a ainsi été montré que lorsque les émulsions sont stabilisées par la SAB, des phénomènes de floculation et de coalescence sont observés. La floculation, induite par des effets complémentaires de la mucine et du pH, des gouttelettes lipidiques est quasi immédiate en présence de mucine à pH acide. Il est en effet connu que la mucine induit, à pH acide, la floculation des gouttelettes lipidiques par les mécanismes de déplétion et/ou de pontage (Vingerhoeds *et al.*, 2005 ; Bansil and Turner, 2006 ; Sarkar *et al.*, 2009). La mucine est en effet capable de former des liaisons hydrogène et/ou hydrophobe avec les molécules de SAB adsorbées aux interfaces (Stephen *et al.*, 1978 ; Hassan and Gallo, 1990). Cette hypothèse a été confirmée par les mesures de la granulométrie des émulsions dont le pH était ajusté à 2,5 ou 4 en absence de mucine et de pepsine qui ne montraient pas de modification de la taille et de l'organisation des gouttelettes lipidiques.

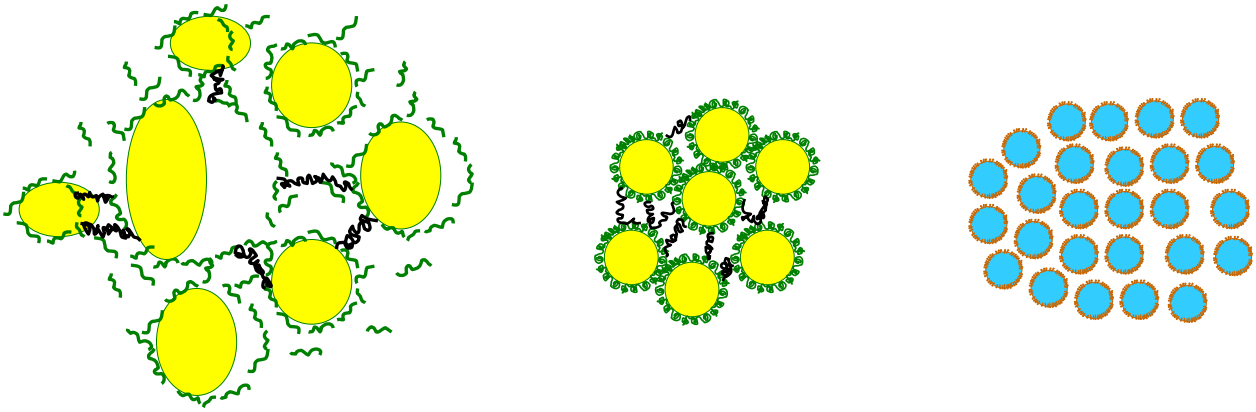
En absence de pepsine, la floculation est plus importante lorsque le pH des milieux gastriques est ajusté à 4 plutôt qu'à 2,5. En effet, le pI de la SAB est de 4,6. Ainsi, à pH 4, l'intensité de la charge positive nette de la SAB est moins importante que celle de la même protéine à pH 2,5. Des études électrophorétiques ont estimé le pI de la mucine gastrique de porc utilisée ici entre 2 et 3 (Lee *et al.*, 2005). Dans les milieux gastriques, à pH 2,5 la mucine aurait donc une charge nette nulle alors que cette charge serait négative à pH 4.

L'intensité de la floculation plus importante à pH 4 s'expliquerait donc par un rapprochement facilité, par effet électrostatique des molécules de mucine de l'interface des gouttelettes lipidiques. Par la suite, les molécules de mucine peuvent former, par liaisons hydrogène ou hydrophobe, des ponts entre les gouttelettes lipidiques et ainsi induire la floculation.

La présence de pepsine, conduit quant à elle à une augmentation de la vitesse initiale de floculation à pH 2,5, vitesse qui est réduite à pH 4. Cette différence peut en partie être expliquée par l'activité protéolytique de la pepsine qui est plus importante à pH 2,5 (>80% de l'activité maximale) qu'à pH 4 (70% de l'activité maximale) (Piper and Fenton, 1965). En plus de cet effet d'amplification de la floculation, la pepsine en hydrolysant la SAB interfaciale induit la coalescence des gouttelettes lipidiques dont l'intensité est indépendante du pH après une heure d'incubation.

Contrairement aux émulsions stabilisées par la SAB dont la structure évolue au cours de la phase gastrique aux pH 2,5 et 4, les émulsions stabilisées par le mélange de phosphatidylcholine et de Tween 80 ne subissent pas d'évolution de leur structure au cours de cette phase à pH 2,5. Ce comportement a antérieurement été observé par (Van Aken *et al.*, 2011) au cours de la digestion gastrique d'émulsions stabilisées par du Tween 80. L'absence d'évolution de la taille des particules de l'émulsion stabilisée par les tensioactifs pourrait s'expliquer de deux manières. D'une part, l'absence de phospholipase dans le suc gastrique conduit, contrairement à ce qui est observée pour la SAB en présence de pepsine, à une absence d'hydrolyse des émulsifiants présents à l'interface des gouttelettes lipidiques et donc de déstabilisation de celles-ci. D'autre part, l'absence d'évolution pourrait venir de l'incapacité de la mucine à former des liaisons hydrogène ou hydrophobe avec la phosphatidylcholine et le Tween 80 présents à l'interface des gouttelettes et ainsi créer des liaisons entre les gouttelettes responsables de la floculation. Enfin cette stabilité en milieu gastrique pourrait également s'expliquer par de la répulsion électrostatique entre gouttelettes. En effet, à pH 2,5 les phosphatidylcholines seraient chargées positivement (Zhou and Raphael, 2007), comme le montrent les valeurs du potentiel zêta des milieux digestifs (annexe 1), conférant ainsi aux gouttelettes une charge nette positive, ce qui induirait leurs répulsions réciproques.

Les évolutions colloidales des gouttelettes lipidiques en fin d'incubation gastrique en fonction de la présence ou non de pepsine et de la nature de l'interface des gouttelettes lipidiques sont schématisées par la figure 43.



A B C

Figure 43 : Évolution colloidale des gouttelettes lipidiques en fin d'incubation gastrique en présence (A) ou en absence (B) de pepsine pour l'émulsion stabilisée par la SAB indépendament du pH, et en présence ou non de pepsine pour l'émulsion stabilisée par les tensioactifs à pH 2,5 (C)

2. Taille et organisation des gouttelettes lipidiques au cours de la phase intestinale de la digestion

L'étude par SLS de l'évolution au cours de la phase intestinale de la taille des gouttelettes lipidiques stabilisées initialement par la SAB a montré l'apparition de structures de petites tailles qui coexistent dans les milieux intestinaux avec des structures de taille plus importante constituées de gouttelettes coalescées. Cette coalescence serait due à la déstabilisation des gouttelettes lipidiques contenues dans les milieux en lien avec les phénomènes de désorption/adsorption compétitive de la SAB partiellement hydrolysée par les sels biliaires contenus dans la bile reconstituée. Après isolement de la phase micellaire et sa caractérisation par DLS couplée avec la détermination de la composition en classes des extraits lipidiques, les structures néoformées de petite taille ont été attribuées à la formation de micelles mixtes et de vésicules constituées à la fois de sels biliaires et de produits d'hydrolyse des lipides. Ces structures sont bien identifiées dans la littérature pour être les structures de solubilisation et de transport des produits de lipolyse (AGL et 2-MAG) avant leur absorption (Hernell *et al.*, 1990 ; Tso, 2000). L'apparition de ces structures, qui apparaît donc comme un indicateur de la lipolyse, est plus rapide lorsque la taille des gouttelettes lipidiques dans les milieux gastriques est faible. Ces résultats sont en accord avec les résultats de la littérature montrant que la vitesse et l'intensité et la lipolyse dépendent de taille des gouttelettes lipidiques (Armand *et al.*, 1997 ; Favé *et al.*, 2004 ; Carrière *et al.*, 2005 ; Armand, 2007).

3. Lipolyse et bioaccessibilité des AG

Cet effet de la taille des gouttelettes sur la lipolyse est clairement visible lors de la détermination de la lipolyse dont la vitesse initiale est très élevée. Il a ainsi été montré, en accord avec les résultats obtenu par DLS, que la coalescence gastrique observée pour l'émulsion stabilisée par la SAB, ralentissait la cinétique de lipolyse intestinale pendant les premiers instants et diminuait significativement le niveau de lipolyse maximal observé après 5 heures d'incubation. Dans ces conditions les faibles taux de lipolyse s'expliquent par la faible surface de contact entre les lipides contenus dans les gouttelettes lipidiques et les lipases présentes dans le milieu aqueux environnant (Sarda and Desnuelle, 1958 ; Benzonana and Desnuelle, 1965). Cependant, après 20 heures d'incubation, les taux d'hydrolyse des TAG (73 – 78 %) sont comparables si ce n'est supérieurs aux valeurs rapportées dans la littérature qui sont de l'ordre de 30 à 70 % (Iverson *et al.*, 1991 ; Carriere *et al.*, 1993 ; Armand *et al.*, 1994 ; Armand *et al.*, 1996 ; Armand *et al.*, 1999). Ceci peut s'expliquer de deux manières. Dans ces études, le temps de digestion est compris entre 30 minutes et 5 heures (considérés couramment comme des temps physiologiques représentatifs des conditions réelles de digestion des lipides) et ne serait pas suffisant pour une digestion totale des lipides, en particulier pour les lipides comportant des AG à longueurs de chaîne supérieure ou égale à 18.

En absence de pepsine dans les sucs gastriques, nous avons constaté que l'intensité de la floculation pourrait avoir un effet sur la lipolyse. En effet, dans ces conditions modèles, après 2, 5 et 20 heures d'incubation, les quantités de lipides absorbables produites sont légèrement plus faibles au cours de la phase intestinale lorsque la floculation est plus importante au cours de la phase gastrique. Cette observation serait en accord avec les aires interfaciales disponibles pour l'activité des lipases. En effet, les mesures granulométriques montrent que moins la floculation est importante (milieux gastriques après incubation à pH 2,5), plus la surface interfaciale disponible mesurée est élevée (1,41 ± 0,02 m^2 g^{-1} à pH 2,5 vs 1,14 ± 0,06 m^2 g^{-1} à pH 4) et plus les proportions de lipides absorbables sont élevées. Ceci corrobore les résultats des travaux de (Mun *et al.*, 2006) qui ont montré au cours de la digestion d'émulsions stabilisées par une lécithine, après adsorption du chitosane par-dessus les phospholipides, que l'intensité de la lipolyse est diminuée lorsque l'interface réelle des gouttelettes n'est pas accessible aux lipases.

Dans le cas des émulsions, stabilisées par le mélange phosphatidyl choline/ Tween 80, il était attendu que les taux de lipolyse soient plus importants que ceux observés pour les

émulsions stabilisées par la SAB, en accord avec les hypothèses liées à la surface interfaciale disponible pour les lipases. Or, après 2 heures d'incubation, les taux de lipolyse sont comparables à ceux obtenus avec les émulsions stabilisées par la SAB dont la taille des gouttelettes est au moins 8 fois plus importante. Ces résultats corroborent ceux de Van Aken *et al.* (2011) qui ont montré que le taux de lipolyse ne diffère pas forcément entre des émulsions stabilisées par des protéines ou par du Tween 80 (Van Aken *et al.*, 2011). Au bout de 2 heures d'incubation, plus de 60% des TAG ne sont pas encore hydrolysés. Ceci pourrait être lié à la quantité d'extrait biliaire ajoutée dans les milieux qui ne serait pas suffisante pour solubiliser les produits de lipolyse qui inhiberaient ainsi l'action des lipases à l'interface. Par ailleurs, l'analyse par HPLC des lipides extraits des milieux de digestion n'a pas fait apparaître d'évolution des quantités de phospholipides non hydrolysés (pas d'apparition dans les chromatogrammes de pics correspondants à l'apparition de lysophospholipides). Dans nos conditions expérimentales aucune hydrolyse de la PC n'a donc pu être mise en évidence. Ces résultats devraient être confirmés en fractionnant au préalable les lipides neutres et polaires des digestats afin d'améliorer la sensibilité de la méthode de quantification des classes lipidiques. Si toutefois ces résultats étaient confirmés, soit les sucs intestinaux ne contenaient pas de phospholipases A susceptibles d'hydrolyser les phospholipides, soit celles-ci n'étaient pas en mesure d'exercer leur action (problème d'accessibilité des substrats aux enzymes liés à la physico-chimie et/ou à l'organisation du milieu).

Il ressort de l'ensemble de ces résultats que les modifications de la taille et de l'organisation des gouttelettes lipidiques, se produisant dans le milieu gastrique au cours de la digestion dépendent de l'organisation initiale des lipides et de la nature des émulsifiants présents dans l'aliment, mais aussi des conditions rencontrées dans le milieu gastrique, et peuvent moduler la lipolyse intestinale ultérieure. Nous avons également démontré que le fait de moduler les conditions rencontrées au cours de la digestion, même en dehors de conditions physiologiques, peut permettre de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les phénomènes observés.

4. Oxydation des lipides au cours de la digestion in vitro

D'après la littérature, de nombreux facteurs liés aux conditions physico-chimiques rencontrées dans le TGI, en particulier au cours de la phase gastrique : un pH acide, la force ionique, la présence d'oxygène ou de peroxydase salivaire, etc. favoriseraient l'oxydation des lipides. D'autres facteurs comme les antioxydants issus des aliments ou des sucs digestifs tendraient au contraire à la limiter : thiocyanate, nitrite, acide urique contenus dans la salive, par exemple (Kanner and Lapidot, 2001 ; Battino *et al.*, 2002 ; Gorelik *et al.*, 2005 ; Gorelik *et al.*, 2007). La température et la force ionique sont aussi des paramètres qui sont susceptibles d'influer notablement sur les vitesses d'oxydation (Jin *et al.*, 2012).

Dans ces études de la littérature, des effets différents des conditions digestives ont été observés en fonction du rapport pro-/anti-oxydants des milieux digestifs, des conditions physicochimiques digestives, de la nature des lipides émulsifiés, de la nature de l'interface et enfin de la taille des gouttelettes lipidiques. L'une des originalités de la présente étude est une approche permettant le contrôle de la quantité d'O_2 présente dans les compartiments digestifs, afin de mimer la diminution progressive du contenu en O_2 des milieux digestifs tout au long du tractus gastro-intestinal. Depuis les travaux de Kanner et Lapidot considérant l'estomac comme un bioréacteur vis-à-vis de l'oxydation des lipides, la majeure partie des études d'oxydation en condition digestive s'est focalisée uniquement sur ce compartiment. En effet, le milieu intestinal, supposé ne pas contenir d'O_2, contient les sucs pancréatico-biliaires dont le caractère réducteur et le pH neutre ou légèrement basique, jouerait plutôt une fonction anti-oxydante (Terao *et al.*, 1995). La seconde originalité de ce travail est la prise en compte du compartiment intestinal dans l'étude du devenir oxydatif des lipides, contrairement aux études antérieures. Il a en effet été montré *in situ* la présence d'oxygène (47 – 188 µmol/l) dans le compartiment intestinal de porc (Hillman *et al.*, 1993). De plus, il a également été montré que l'émulsification induite par les sels biliaires contenus dans le suc pancréatico-biliaire de rat en présence du Fe^{2+} a un effet pro-oxydant (Terao *et al.*, 1995). Ceci nous a incité à nous poser la question de la possibilité d'une poursuite des réactions d'oxydation des lipides au cours de la phase intestinale de la digestion.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse conforte cette hypothèse. Ils apportent également des éléments nouveaux sur l'importance majeure de la balance entre pro- et antioxydants dans les milieux de digestion, rapportée aux caractéristiques du substrat considéré, en lien avec ses structures à la fois moléculaires et supramoléculaires.

4.1 Effets du rapport pro-/anti-oxydants dans les milieux digestifs

Soumises aux conditions digestives conduites en environnement clos, l'effet protecteur des antioxydants (tocophérols) présent dans les huiles s'est révélé dépendre de la présence ou non de metmyoglobine et de la composition des huiles en AGPI.

Les tocophérols à une concentration d'environ 550 mg kg^{-1} d'huile protègent efficacement les lipides de l'émulsion d'huile de colza, riche en LA et ALA, ainsi que ceux contenus dans les émulsions d'huile riche en AGPI LC (EPA et DHA). Cependant la simulation d'une alimentation carnée par ajout aux milieux de la metmyoglobine (concentration finale : 20 µM), conduit à l'oxydation des huiles riches en AGPI LC alors que le phénomène reste plus limité avec l'huile riche en LA et ALA qui possèdent un nombre d'insaturation plus faible. Cette observation montre qu'en présence d'initiateur de l'oxydation lipidique, les anti-oxydants alimentaires ne sont pas suffisants pour protéger les huiles riches en AGPI LC au cours de la digestion contrairement à ce qui est observé avec les AGPI à chaînes plus courtes. Ceci s'explique par la plus grande oxydabilité des AGPI LC. L'élimination des tocophérols dans l'huile de colza conduit à l'oxydation des lipides en conditions digestives, ce qui confirme l'effet protecteur des tocophérols. Cet effet protecteur à été étudié en détail avec l'émulsion stabilisée par les tensioactifs. Les résultats ont montré que l'oxydation se produisait dans les milieux intestinaux lorsque pratiquement tous les tocophérols étaient consommés. Une utilisation préférentielle des tocophérols a également été observée suivant l'ordre α-tocophérol (presque totalement consommée dès l'ajout de metmyoglobine) > γ-tocophérol > β-tocophérol > δ-tocophérol. Considérant que plus un antioxydant est puissant, plus longtemps s'exprime son activité, le pouvoir antioxydant des tocophérols dans notre système suit l'ordre α-tocophérol < γ-tocophérol < β-tocophérol < δ-tocophérol. Ainsi, nos résultats sont en accord avec les travaux de (Koskas *et al.*, 1984 ; Kamal-Eldin and Appelqvist, 1996) réalisés au cours de la conservation en conditions d'oxydation accélérées des huiles et montrant que l'activité anti-oxydante des tocophérols suit l'ordre $\alpha < \gamma \approx \beta < \delta$ lorsqu'ils sont présents dans les lipides ou dans des lipoprotéines.

4.2 Effets de la nature des lipides émulsifiés sur la formation de différents marqueurs de l'oxydation

Au regard des cinétiques d'évolution et des quantités de marqueurs de l'oxydation mesurées, en présence de metmyoglobine, des quantités très importantes de produits primaires et secondaires de l'oxydation des lipides sont formés. Les quantités d'HPX dans les milieux contenant les émulsions stabilisées par la SAB sont similaires indépendamment de la nature des milieux digestifs, du temps d'incubation et de la nature des AG : une quantité maximale d'HPX d'environ 110 µmol g^{-1} de lipides est observée quelles que soient les conditions. Or, des quantités plus élevées d'HPX dans les milieux obtenus avec l'émulsion « n-3-LC_SAB », contenant les AGPI LC, que dans ceux obtenus avec l'émulsion d'huile de colza, contenant comme AGPI l'ALA et le LA, étaient attendues comme c'est le cas pour les quantités de MDA. En effet, à partir de 45 minutes d'incubation gastrique, et pendant l'incubation intestinale, les quantités de MDA dans les milieux avec l'émulsion riche en AGPI LC sont nettement plus importantes qu'avec l'émulsion d'huile de colza ne contenant que les AGPI à 18 carbones et comportant au maximum 3 doubles liaisons. Il est important de garder à l'esprit que les HPX sont des molécules très instables. Les quantités d'HPX dosées ne correspondent pas aux quantités formées, mais représentent, au temps considéré, la quantité résiduelle issue de la différence entre la quantité formée et la fraction décomposée en produits secondaires. Des différences importantes dans les vitesses de décomposition des hydroperoxydes selon l'insaturation de l'acide gras dont ils sont issus peuvent fournir un élément d'explication à cette apparente contradiction entre les résultats obtenus avec le dosage des HPX et du MDA. En effet, les HPX issus de l'oxydation des AGPI LC tendent à former des peroxydes cycliques, non dosés par nos méthodes, ou à se décomposer très rapidement en produits secondaires. Ainsi, les quantités d'hydroperoxydes mesurées au cours du stockage ou de conservation en conditions accélérées d'huiles marines ou d'émulsions préparées avec ces huiles restent souvent relativement faibles et relativement stables, malgré la formation continue de produits secondaires.

Il est à noter que ces valeurs de concentrations en MDA mesurées pendant la phase intestinale (200-250 µM) sont supérieures aux valeurs conduisant à une augmentation de deux fois la fréquence des mutations dans des cellules hépatiques humaines qui sont de 10-100 µM (Niedernhofer *et al.*, 2003). Des études effectuées sur les effets d'antioxydants polyphénoliques sur l'oxydation des lipides de viandes soumises à des conditions gastriques *in vitro* ont montré des concentrations de substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS, exprimées en équivalents MDA) variaient de 25-60 µM en absence de polyphénols

à 11-20 µM après 180 minutes en présence de polyphénols (Tesoriere *et al.*, 2007 ; Tagliazucchi *et al.*, 2010 ; Verzelloni *et al.*, 2010). Ces valeurs sont similaires à celles que nous avons obtenues malgré les quelques différences dans le système d'étude qui concernent notamment la teneur en lipides, plus élevée dans notre cas, et la méthode de quantification du MDA.

La quantification du 4-HHE, produit de l'oxydation spécifique des AGPI n-3 et du 4-HNE, produit de l'oxydation spécifique des AGPI n-6, a permis de fournir des éléments complémentaires concernant la spécificité de l'oxydation des AGPI en fonction de leur insaturation et de leur concentration dans les huiles ainsi que sur la réactivité accrue des AGPI LC. En effet, les quantités de 4-HHE formées dans l'huile de colza, comparées aux quantités de 4-HNE montrent que l'ALA joue un rôle prépondérant dans l'oxydation de cette huile. La quantité de 4-HNE en fin de phase intestinale est plus élevée pour l'huile de colza contenant 19 % de n-6 comparée à l'huile riche en AGPI LC qui en contenait 2 fois moins.

Avec les émulsions d'huiles riches en AGPI LC, les concentrations molaires en 4-HHE étaient comprises entre 5,64 ± 0,19 à 7,23 ± 1,08 µM et celles de 4-HNE entre 1,01 ± 0,08 à 1,58 ± 0,18 µM. Ces concentrations sont comprises dans la gamme de concentrations pour lesquelles on note des effets toxiques (1-20 µM) incluant une inhibition de la synthèse de l'ADN et des protéines, la stimulation de la phospholipase C, une inhibition de l'expression de la C-myc, protooncogène qui code pour un facteur de transcription qui, si le gène est muté ou surexprimé ne se fixe pas correctement sur le gène cible et peut causer le cancer (Esterbauer *et al.*, 1991). La LD_{50} du 4-HHE et du 4-HNE mesurée avec des neurones primaires corticaux est de 23 et 18 µM respectivement (Long *et al.*, 2008). Il ressort que dans les conditions digestives testées ici, l'enrichissement des huiles en AGPI LC représenterait un risque toxique non négligeable.

4.3 Effets de la taille et de la nature de l'interface sur l'oxydation des lipides en conditions digestives

Pendant la phase gastrique, pour les huiles riches en AGPI LC présentes dans l'émulsion nanométrique stabilisée par la phosphatidyl choline et le Tween 80, l'oxydation ne débute qu'après la phase gastrique dans les milieux intestinaux, contrairement aux émulsions micrométriques stabilisées par la SAB pour lesquelles l'oxydation débute très rapidement après ajout de la metmyoglobine dans les milieux gastriques. Certaines études ont montré, indépendamment de la nature chimique de l'émulsifiant dans des systèmes modèles, que plus la taille des gouttelettes des lipides émulsifiés est faible, plus la surface de contact entre les

lipides est élevées et plus important est le phénomène d'oxydation (Gohtani *et al.*, 1999 ; Lethuaut *et al.*, 2002 ; Nakaya *et al.*, 2005). L'absence d'effet amplificateur de la taille réduite des gouttelettes de lipides émulsifiés dans les conditions digestives montre que la composition de l'interface serait plus déterminante que l'aire interfaciale vis-à-vis de l'oxydation des lipides (Let *et al.*, 2007) pendant la digestion. La comparaison des résultats obtenus dans les conditions physicochimiques intestinales en absence des sucs pancréatico-biliaires et en leur présence pourrait permettre de mettre en évidence l'effet de la taille des gouttelettes lipidiques sur l'oxydation. En effet, quel que soit le marqueur d'oxydation considéré, après 30 minutes d'incubation, l'oxydation est plus importante dans les milieux intestinaux ne contenant pas les sucs (gouttelettes de taille nanométrique) que dans les milieux contenant les sucs dans lesquels la formation de structures lipidiques de grande taille, en plus de la formation de structures de solubilisation, ont été mises en évidences par DLS. Toutefois, l'effet protecteur de la présence des sucs pancréatico-biliaires peut également s'expliquer par l'effet protecteur lié à l'hydrolyse des AGPI LC sur leur oxydation. En effet, des travaux évaluant l'effet de la lipolyse en condition intestinale, par la lipase pancréatique de porc, d'émulsion d'huile de poisson sur la formation de TBARS en présence de metmyoglobine ont montré quelle avait un effet protecteur (Terao, 2001). Ces travaux avaient été initiés par la mise en évidence du fait que les DHA et l'EPA réputés très peroxydables étaient de manière inattendue très stables vis-à-vis de l'oxydation lorsqu'ils sont incorporés en milieux aqueux aux micelles après leur libération des TAG au sein desquels leur peroxydabilité était élevée (Bruna *et al.*, 1989 ; Miyashita *et al.*, 1993 ; Yazu *et al.*, 1996).

Avec le dispositif expérimental utilisé au cours de cette étude, il est difficile de dissocier les effets de la taille des gouttelettes lipidiques de ceux liés à la nature de l'interface (ou à la nature de l'émulsifiant). Les résultats obtenus montrent un effet protecteur des tensioactifs (PC et Tween 80) pendant la phase gastrique, effet qui n'est pas observé lorsque la SAB est utilisée comme émulsifiant. Cette observation est en accord avec celle selon laquelle l'oxydation lipidique est plus rapide lorsque l'interface est stabilisée par des protéines (SAB, β-lac, caséine) comparée aux tensioactifs (PC, Tween 20-80,…) (Lorrain *et al.*, 2010 ; Berton *et al.*, 2011 ; Berton *et al.*, 2012). Le mécanisme impliqué dans ces phénomènes fait appel à la formation d'une interface plus compacte et plus homogène par les tensioactifs, qui gênerait l'accès aux lipides des initiateurs d'oxydation, contrairement aux protéines (Berton *et al.*, 2011).

L'acidité de la phase gastrique au cours de la digestion pourrait donc bien avoir un rôle promoteur de l'oxydation. Kanner et Lapidot (2001) ont suggéré qu'un pH acide (1,5) augmenterait l'activité des catalyseurs de l'oxydation (notamment de la myoglobine) en présence d'oxygène et ainsi la peroxydation lipidique. Cet effet promoteur de l'oxydation d'un pH acide a été rapporté dans des revues comme celle de Genot *et al.* (Genot *et al.*, 2003) et confirmé dans l'article récent de Horn *et al.* (Horn *et al.*, 2012).

4.4 Comprendre les mécanismes de l'oxydation en milieu digestif : complémentarité des marqueurs de l'oxydation

Nous avons montré au cours de ce travail qu'il est indispensable, pour une étude précise du phénomène d'oxydation de prendre en compte les informations générées au moyen de plusieurs marqueurs d'oxydation. En effet, en considérant la consommation d'O_2 et la formation de HPX et de MDA dans les émulsions stabilisées par la SAB, on ne met pas en évidence d'effet des sucs digestifs sur l'oxydation au cours de la digestion, bien qu'une tendance à favoriser la formation d'HPX en fin de phase intestinale soit observée. Par contre, en considérant les 4-HHE et 4-HNE, un effet net des sucs pancréatico-biliaires est observé. En effet, une heure après ajout de ces sucs, il se forme dans les milieux digestifs plus de 4-HHE et de 4-HNE que dans les milieux qui en sont dépourvus. Cette observation s'explique d'une part par l'émulsification induite par les sels biliaires, dont l'effet pro-oxydant a été mis en évidence sur des phospholipides en présence du Fe^{2+} et d'autre part par l'augmentation de la décomposition des HPX lipidiques en présence des sucs pancréatico-biliaires (Terao *et al.*, 1995). En effet, il a été montré que le suc pancréatico-biliaire de rat contient des composés ayant les fonctions à la fois de piégeurs de radicaux libres et de décomposition des produits primaires d'oxydation des lipides formés au cours de la phase gastrique (Terao *et al.*, 1995). Ces composés, comme par exemple la bilirubine conjuguée, sont pour l'essentiel contenus dans la bile, (Adhikari *et al.*, 1998). Cet effet pro-oxydant des sucs pancréatico-biliaires, qui n'est pas observé pour les émulsions stabilisées par la SAB au moyen des marqueurs autres que les HAs, l'est pour tous les marqueurs utilisés pour évaluer l'oxydation des émulsions stabilisées par les tensioactifs. En effet, pour cette émulsion, pendant la phase intestinale, un effet contraire est observé. Contrairement à l'effet amplificateur possible des sucs pancréatico-biliaires observé pour les émulsions stabilisées par la protéine, ces sucs protègeraient les émulsions stabilisées par les tensioactifs de l'oxydation, mettant en évidence

une possible interaction complexe entre les effets des sucs digestifs et de la nature de l'émulsifiant utilisé.

Avec l'émulsion stabilisée par les tensioactifs, un comportement inhabituel dans l'évolution des cinétiques d'oxydation a été observé de manière systématique lors des cinétiques d'oxydation des milieux témoins, ne contenant pas de sucs digestifs. Cette évolution est observable à la fois pour le marqueur peu spécifique de l'oxydation qu'est la consommation d'oxygène ou pour des marqueurs spécifiques de l'oxydation des lipides (HPX et MDA). En effet, à 60 minutes d'incubation intestinale une diminution de la consommation d'O_2 et des quantités de produits primaires et secondaires formés, suivie d'une reprise de l'augmentation à 90 min, ont été observées au cours des trois répétitions effectuées dans ces conditions. Nous faisons l'hypothèse qu'à cette étape, il y a formation d'oxygène moléculaire par disproportionation radicalaire entre 2 molécules de radical hydroperoxyle (Schaich, 2012). Cette génération d'O_2, n'est pas observée dans les milieux contenant les fluides digestifs pour lesquels les quantités maximales de produits d'oxydation formées sont similaires ou inférieures à celles des milieux témoins à 30 minutes d'incubation intestinale. Ainsi, la génération d'O_2 ne pourrait se produire qu'après qu'une certaine quantité de produits d'oxydation, vraisemblablement les LOO° à concentration élevée (Schaich, 2012), aie été formée. Compte-tenu de nos observations nous proposons que pour une concentration en HPX supérieure à 60 µmol g^{-1} de lipides, les radicaux hydroperoxyles réagissent entre eux au cours d'une réaction de disproportionation radicalaire avec génération d'oxygène. Ces conditions, conduiraient à une terminaison partielle du processus d'oxydation. Au cours de cette phase, il n'y aurait pas production d'HPX, par contre, les HPX déjà présents dans le milieu seraient toujours susceptibles de se décomposer, ce qui entrainerait une diminution temporaire de leur quantité mesurée dans les milieux. La diminution en parallèle des quantités de MDA s'explique de la même façon. En effet, le MDA est formé par décomposition des hydroperoxydes lipidiques. Ainsi, si la quantité d'HPX diminue dans le milieu, la quantité de MDA produite diminue également. Il est à noter cependant que le MDA est une molécule réactive qui peut se fixer aux molécules nucléophiles présentes dans les milieux digestifs (protéines, phospholipides, …). Les quantités mesurées ne représentent pas les quantités réellement formées mais leur fraction libre. Cette fraction libre, qui est la seule quantifiable avec notre méthodologie est issue d'un équilibre entre les quantités formées et les quantités fixées. En faisant l'hypothèse que la proportion de MDA fixé reste similaire à cette étape de la digestion, si la formation de MDA se trouve diminuée, comme nous le suggérons, la quantité de MDA libre diminue également. Cette étape intermédiaire au cours

de laquelle les réactions de terminaison seraient favorisées ne durerait pas plus d'une heure vu qu'à 90 minutes d'incubation, la quantité de marqueurs d'oxydation est de nouveau élevée et continue d'augmenter jusqu'à 2 heures.

4.5 Évaluation de la validité des résultats chez la souris

Au terme de l'étude *in vitro* des expérimentations animale chez la souris ont été effectuées pour vérifier la validité des résultats obtenus *in vitro* quant à l'effet de la metmyoglobine. Cette étude, en raison des difficultés expérimentales rencontrées, a permis de conclure à l'inadéquation du modèle souris pour répondre à ces questions. Toutefois, elle a démontré la faisabilité de l'étude de l'oxydation des lipides alimentaires tout au long du tractus digestif au cours de la digestion, dans les différents compartiments d'intérêt, en choisissant cependant un modèle plus approprié, notamment en termes de taille des prélèvements.

Par ailleurs, la quantification des HAs plasmatiques a permis de mettre en évidence un effet de la présence de metmyoglobine sur les concentrations plasmatiques après gavage. Cet effet n'a, pour les raisons expérimentales et méthodologiques évoquées précédemment, pas pu être directement attribué à l'oxydation des lipides qui se produirait dans le TGI.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Des travaux récents ont permis de démontrer que les bénéfices nutritionnels associés à la consommation d'acides gras polyinsaturés, notamment celle des AGPI n-3, notamment *via* leur métabolisme, dépendent du devenir des structures des lipides présentes dans l'aliment. La consommation d'AGPI peut également être associée à celle de composés issus de leur peroxydation. Or l'absorption de certains de ces composés pourrait être associée à une augmentation de l'inflammation et du stress oxydant *in vivo* (Awada *et al.*, 2012). Quand ce travail a démarré, seuls quelques travaux précurseurs (Kanner and Lapidot, 2001 ; Gorelik *et al.*, 2008 ; Lorrain *et al.*, 2010) avaient porté sur la formation de produits d'oxydation des lipides au cours de la digestion réalisée sur des modèles simplifiés du milieu digestif, principalement lors de la phase gastrique. Ces travaux n'envisageaient pas la question des liens entre l'évolution des structures moléculaires et supramoléculaires des lipides au cours de la digestion et leur oxydation, ni celle de la possible formation de produits issus de l'oxydation des lipides au cours de la phase intestinale de la digestion.

Ce travail de thèse visait à déterminer *in vitro* si l'organisation moléculaire des lipides alimentaires et leur évolution au cours de la digestion pouvait moduler les cinétiques de lipolyse et la formation de produits issus de l'oxydation des lipides. Nous avons également cherché à comprendre l'importance de paramètres liés à la composition des milieux de digestion sur les évolutions mentionnées précédemment. L'ensemble des expérimentations a été réalisé sur des émulsions modèles, ce qui a permis de faire varier différents paramètres de structure et de composition relatifs à la phase lipidique et aux interfaces huile-eau.

Des avancées méthodologiques majeures

La première partie du travail a porté sur la mise au point de conditions de digestion *in vitro*. Sur la base de l'analyse de la bibliographie, nous avons adapté à nos contraintes spécifiques les conditions utilisées pour déterminer *in vitro* la bioaccessibilité de micronutriments lipophiles. Ces conditions sont basées sur une procédure de digestion 'en batch' comprenant une phase gastrique et une phase duodénale et utilisant des fluides digestifs simulés. Pour prendre en compte des contraintes liées à la diminution progressive de la pression en oxygène dans le tractus gastro-intestinal, les expérimentations portant spécifiquement sur l'oxydation des lipides au cours de la digestion ont été réalisées en milieux clos, ce qui a nécessité une seconde phase de mise au point expérimentale. Ainsi, la quantité totale d'oxygène disponible lors de la digestion était limitée, comme c'est le cas *in vivo*. Pour faire la part entre les quantités de produits de lipolyse ou d'oxydation formés dans

les milieux digestifs et les quantités bioaccessibles (absorbables), les composés visés (acides gras libres et monoglygérides, hydroperoxydes totaux, MDA, 4-HHE, 4-HNE) ont été dosés dans les milieux digestifs totaux. Il est à noter que, de plus, les méthodes d'extraction des lipides et de quantification des produits de lipolyse et d'oxydation ont du être adaptées et validées pour nos substrats et conditions expérimentales. L'ensemble de ces mises au point constituent une avancée méthodologique majeure qui sera mise à profit au delà de cette thèse dans divers programmes de recherche nationaux et européens (ANR et COST FA 1005 Infogest).

La composition du fluide gastrique influence l'évolution des structures colloïdales et la lipolyse lors de la digestion *in vitro* d'émulsions stabilisées par des protéines.

Nous avons montré (article 2) que la présence de pepsine dans le suc gastrique provoque, en phase gastrique, la coalescence des gouttelettes lipidiques stabilisée par une protéine, probablement du fait de l'hydrolyse très rapide de cette protéine à l'interface. En absence de pepsine, les gouttelettes lipidiques conservent leur intégrité jusqu'à leur passage en phase intestinale. Dans ces conditions, la lipolyse en phase intestinale tend à être plus rapide, probablement du fait de la grande surface d'interface disponible pour l'adsorption des lipases. Par contre, le pH utilisé lors de la phase gastrique de la digestion, s'il peut modifier à la marge les phénomènes de floculation pendant la phase gastrique, n'affecte pas la lipolyse ultérieure en phase intestinale.

L'évolution colloïdale des structures lipidiques au cours de la digestion dépend de la structuration initiale des lipides (taille des gouttelettes + nature de l'interface) dans l'aliment. Cette évolution colloïdale module les cinétiques de lipolyse intestinale.

Les émulsions (taille moyenne > 1µm) stabilisées par la SAB subissent de fortes réorganisations dès la phase gastrique tandis que les émulsions sub-microniques (taille moyenne ≈ 200 nm) stabilisées par un mélange phosphatidylcholine/Tween 80 ne subissent pas d'agrégation et de coalescence en phase gastrique mais voient de forts changements structuraux en phase intestinale. Ces différences d'évolution structurale lors de la phase gastrique n'auraient cependant pas d'impact notable sur les taux de lipolyse et d'oxydation après deux heures de phase intestinale. Cependant, il est permis de s'interroger sur l'absence de lipase susceptible d'amorcer la lipolyse en phase gastrique comme c'est le cas *in vivo*.

L'oxydation des lipides au cours du processus de digestion est plus liée aux conditions physicochimiques de la digestion qu'à la présence des sucs digestifs.

Ainsi, les quantités de produits d'oxydation formés dans les milieux digestifs sont similaires dans les conditions de digestion *in vitro* et quand les émulsions sont placées dans les mêmes conditions physicochimiques (dilution, pH ; force ionique, température) mais en l'absence des sucs digestifs, en particulier pour les émulsions stabilisées par la sérum albumine bovine. Cependant, quand les lipides sont émulsifiés par des phospholipides, les sucs digestifs exerceraient un effet de protection contre l'oxydation en phase intestinale, effet non observé avec la protéine.

Les concentrations respectives d'agents prooxydants (metmyoglobine), antioxydants liposolubles (tocophérols) et la nature des acides gras présents dans l'aliment sont des déterminants majeurs de l'oxydation au cours de la digestion.

Ces effets confirment les données antérieures sur les facteurs déterminants de l'oxydation des lipides que ce soit dans des milieux modèles comme des micelles, des liposomes ou des émulsions modèles, dans des aliments, ou au cours de la digestion simulée (Kanner and Lapidot, 2001 ; Lorrain *et al.*, 2012). Il ressort clairement de nos résultats que l'apport d'acides gras polyinsaturés à longues chaines doit être regardé à la lumière de leur fort potentiel à s'oxyder, en particulier quand cette consommation se fait simultanément à celle d'agents pro-oxydants, comme la metmyoglobine présente dans les viandes rouges, ou dans le cas d'une alimentation pauvre en antioxydants (lipophiles ou plutôt hydrophiles). L'originalité de nos travaux réside en grande partie dans l'obtention de données quantitatives sur les niveaux de produits potentiellement toxiques (malondialdéhyde, 4-HNE et 4-HHE) formés dans les différentes phases de la digestion. De plus, nous avons montré pour la première fois que l'oxydation des lipides, et la formation de produits d'oxydation secondaires potentiellement toxiques ne se limite pas à la phase gastrique mais continue au cours de la phase intestinale.

Enfin, les données sur l'oxydation *in vitro* ont été comparées avec des résultats obtenus *in vivo* dans le contenu digestif et dans le plasma chez la souris.

Il apparaît que, comme nous avons observé au cours de la digestion *in vitro*, l'évolution des niveaux de MDA, 4-HNE et 4-HHE dans le plasma des souris gavées avec une émulsion riche en AGPI LC dépend de la présence ou non de metmyoglobine dans le milieu digestif. Par contre, le recueil et l'analyse des contenus digestifs ont mis en lumière des problèmes expérimentaux, lié notamment au modèle animal choisi, qui devront être résolus ultérieurement.

PERSPECTIVES

La stratégie utilisée dans ce travail permet d'approcher au niveau mécanistique les effets de l'équilibre pro-/anti-oxydant des milieux digestifs, de la nature et la composition en AGPI des lipides digérés, de l'évolution de leur structure supramoléculaire et colloïdale, de la nature des émulsifiants, de la composition des sucs pancréatico-biliaires et de l'activité lipolytique. Elle doit cependant être complétée pour prendre en compte les difficultés rencontrées et les limites de certaines méthodologies utilisées, et pour se rapprocher encore plus des conditions physiologiques réelles. En parallèle, des expérimentations ciblées, permettraient de mieux discriminer et comprendre les effets des facteurs pris individuellement.

Il serait de ce fait intéressant dans un premier temps de compléter le modèle de digestion actuel utilisé en y intégrant une phase buccale avec ajout de la salive. En effet, l'implication potentielle des composants salivaires dans l'évolution des structures des lipides et dans le processus d'oxydation au cours de la digestion a déjà été démontrée (Kanner and Lapidot, 2001). Par ailleurs, considérant l'effet possible de la lipolyse sur l'oxydabilité des AGPI, il serait très pertinent soit de disposer de suc gastrique humain, soit de mettre une lipase active en milieu acide dans le compartiment gastrique.

Des études effectuées au laboratoire en parallèle de ce travail ont montré que les proportions d'extraits biliaires utilisées ne sont pas suffisantes pour solubiliser tous les produits d'hydrolyse formés, notamment ceux contenant des AGPI-LC, ceci pouvant avoir pour effet une inhibition de l'activité des lipases. En effet, les produits de lipolyse non solubilisés dans les vésicules et les micelles mixtes de sels biliaires (présents en quantité insuffisante) saturent l'interface des gouttelettes lipidiques et déplacent les lipases qui pourraient ainsi être inactivées. Les quantités d'extrait biliaire devront donc être augmentées. Cette augmentation pourrait s'appuyer sur les concentrations physiologiques en sels biliaires des milieux digestifs. Après s'être assuré ainsi de la solubilisation complète des produits de lipolyse dans les micelles, nous pourrions ainsi étudier plus précisément la bioaccessibilité des AGPI et son effet sur le processus d'oxydation et la bioaccessibilité des produits d'oxydation.

La discrimination entre les effets individuels de la taille et de la nature de l'interface devrait être effectuée en effectuant des expérimentations sur deux émulsions supplémentaires,

une de taille nanométrique et stabilisée par la SAB et une autre de taille micrométrique stabilisée par les tensioactifs.

Les structures de transports (micelles, vésicules) ont été attribuées aux structures de petites tailles formées au cours de la digestion intestinale par une démarche indirecte. En effet, il est difficile d'identifier ces structures au moyen de la microscopie électronique qui nécessite des prétraitements des échantillons incluant leur dilution, ce qui modifierait ces structures qui sont dynamiques et sensibles aux réelles concentrations des différents agents tensio-actifs dans le milieu. Il est cependant connu que les micelles diluées dans des solutions inter-micellaires conservent leur structure initiale (Son and Alkan, 1989 ; Cohen and Carey, 1990 ; Stone *et al.*, 1992 ; Kossena *et al.*, 2003), ce qui pourrait être utilisée pour des essais d'identification réelle de ces structures.

L'évaluation de la validité des résultats obtenus *in vitro* chez la souris à permis de mettre en évidence les limites de ce modèle animal pour une telle étude. Pour de futures études le choix devrait se porter sur des animaux pouvant permettre d'avoir une certaine marge de manœuvre en termes de quantité d'échantillon et de facilité de mise en œuvre de l'expérimentation. Les recommandations se porteraient vers les *minipigs*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adhikari S., Joshi R. and Gopinathan C. (1998). Bilirubin as an anti precipitant against copper mediated denaturation of bovine serum albumin: formation of copper-bilirubin complex. *Biochimica and Biophysica Acta* **1380**(1): 109-114.

AFSSA (2009). Étude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires 2 (INCA 2) 2006-2007. *http://www.anses.fr/Documents/PASER-Ra-INCA2.pdf*: 228p.

AFSSA (2010). Avis de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments relatif à l'actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras. In *AFSSA - Saisine n° 2006-SA-0359 http://www.anses.fr/Documents/NUT2006sa0359.pdf*, pp. 10.

American Dietetic Association (2001). Position of the American Dietetic Association: food fortification and dietary supplements. *Journal of the American Dietetic Association* **101**(1): 115-125.

Armand M. (2007). Lipases and lipolysis in the human digestive tract: where do we stand? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **10**: 156-164.

Armand M., Borel P., Dubois C., Senft M., Peyrot J., Salducci J., Lafont H. and Lairon D. (1994). Characterization of emulsions and lipolysis of dietary lipids in the human stomach. *American Journal of Physiology (Gastrointestinal Liver Physiology)* **266**(29): G372-G381.

Armand M., Borel P., Pasquier B., Dubois C., Senft M., Andre M., Peyrot J., Salducci J. and Lairon D. (1996). Physicochemical characteristics of emulsions during fat digestion in human stomach and duodenum. *American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology* **271**(34): G172-G183.

Armand M., Pasquier B., Andre M., Borel P., Senft M., Peyrot J., Salducci J., Portugal H., Jaussan V. and Lairon D. (1999). Digestion and adsorption of 2 fat emulsions with different droplet sizes in the human digestive tract. *American Journal of Clinical Nutrition* **70**: 1096-1106.

Armand M., Pasquier B., Borel P., Andre M., Senft M., Peyrot J., Salducci J. and Lairon D. (1997). Emulsion and absorption of lipids: the importance of physicochemical properties. *Ocl-Oleagineux Corps Gras Lipides* **4**(3): 178–185.

Awada M., Soulage C. O., Meynier A., Debard C., Plaisancié P., Benoit B., Picard G., Loizon E., Chauvin M. A., Estienne M., Peretti N., Guichardant M., Lagarde M., Genot C. and Michalski M. C. (2012). Dietary oxidized n-3 PUFA induce oxidative stress and inflammation: role of intestinal absorption of 4-HHE and reactivity in intestinal cells. *Journal of Lipid Research* **53**(10): 2069-2080.

Bang H. O., Dyerberg J. and Hjørne N. (1976). The composition of food consumed by greenland eskimos. *Acta Medica Scandinavica* **200**(1-6): 69-73.

Bansil R. and Turner B. S. (2006). Mucin structure, aggregation, physiological function and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **11**(2-3): 164-170.

Battino M., Ferreiro M. S., Gallardo I., Newman H. N. and Bullon P. (2002). The antioxidant capacity of saliva. *Journal of Clinical Periodontology* **29**: 189-194.

Bauer E., Jakob S. and Mosenthin R. (2005). Principles of physiology of lipid digestion. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **18**(2): 282-295.

Benichou A., Aserin A. and Garti N. (2004). Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active matters. *Advances in Colloid and Interface Science* **108-109**: 29-41.

Benzonana G. and Desnuelle P. (1965). Kinetic study of the action of pancreatic lipase on emulsified triglycerides. Enzymology assay in heterogeneous medium. *Biochimica et Biophysica Acta* **105**(1): 121-136.

Berry S. E., Miller G. J. and Sanders T. A. (2007). The solid fat content of stearic acid-rich fats determines their postprandial effects. *American Journal of Clinical Nutrition* **85**(6): 1486-1494.

Berton C., Ropers M.-H., Bertrand D., Viau M. and Genot C. (2012). Oxidative stability of oil-in-water emulsions stabilised with protein or surfactant emulsifiers in various oxidation conditions. *Food Chemistry* **131**(4): 1360-1369.

Berton C., Ropers M.-H., Viau M. and Genot C. (2011). Contribution of the interfacial layer to the protection of emulsified lipids against oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**(9): 5052-5061.

Beysseriat M., Decker E. A. and McClements D. J. (2006). Preliminary study of the influence of dietary fiber on the properties of oil-in-water emulsions passing through an *in vitro* human digestion model. *Food Hydrocolloids* **20**: 800-809.

Billman G., Kang J. and Leaf A. (1997). Prevention of ischemia-induced cardiac sudden death by n−3 polyunsaturated fatty acids in dogs. *Lipids* **32**(11): 1161-1168.

Bligh E. G. and Dyer W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **37**(8): 911-917.

Botsoglou N. A., Fletouris D. J., Papageorgiou G. E., Vassilopoulos V. N., Mantis A. J. and Trakatellis A. G. (1994). Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **42**(9): 1931-1937.

Breslow J. L. (2006). n-3 fatty acids and cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition* **83**(6 Suppl): 1477S-1482S.

Bruna E., Petit E., Beljean-Leymarie M., Huynh S. and Nouvelot A. (1989). Specific susceptibility of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid to peroxidation in aqueous solution. *Lipids* **24**(11): 970-975.

Burr G. O. and Burr M. M. (1930). On the nature and rôle of the fatty acids essential in nutrition. *Journal of Biological Chemistry* **86**(2): 587-621.

Burr M. L., Gilbert J. F., Holliday R. M., Elwood P. C., Fehily A. M., Rogers S., Sweetnam P. M. and Deadman N. M. (1989). Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *The Lancet* **334**(8666): 757-761.

Burton D. D., Kim H. J., Camilleri M., Stephens D. A., Mullan B. P., O'Connor M. K. and Talley N. J. (2005). Relationship of gastric emptying and volume changes after a solid meal in humans. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* **289**(2): G261-G266.

Buttriss J. L. and Diplock A. T. (1984). High-performance liquid chromatography methods for vitamin E in tissues. *Methods in Enzymology* **105**: 131-138.

Cangemi F. E. (2007). TOZAL study: an open case control study of an oral antioxidant and omega-3 supplement for dry AMD. *BMC Ophthalmology* **7:3**.

Carriere F., Barrowman J. A., Verger R. and Laugier R. (1993). Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. *Gastroenterology* **105**: 876-888.

Carrière F., Grandval P., Gregory P. C., Renou C., Henniges F., Sander-Struckmeier S. and Laugier R. (2005). Does the pancreas really produce much more lipase than required for fat digestion? *Journal of the Pancreas* **6**(3): 206-215.

Carrière F., Renou C., Lopez V., De Caro J., Ferrato F., Lengsfeld H., De Caro A., Laugier R. and Verger R. (2000). The specific activities of human digestive lipases measured from the in vivo and in vitro lipolysis of test meals. *Gastroenterology* **119**(4): 949-960.

Carrière F., Rogalska E., Cudrey C., Ferrato F., Laugier R. and Verger R. (1997). *In vivo* and in vitro studies on the stereoselective hydrolysis of tri- and diglycerides by gastric and pancreatic lipases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **5**(2): 429-435.

Certík M., Andráši P. and Šajbidor J. (1996). Effect of extraction methods on lipid yield and fatty acid composition of lipid classes containing gamma-linolenic acid extracted from fungi. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **73**(3): 357-365.

Chanamai R. and McClements D. J. (2000a). Creaming stability of flocculated monodisperse oil-in-water emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science* **225**(1): 214-218.

Chanamai R. and McClements D. J. (2000b). Dependence of creaming and rheology of monodisperse oil-in-water emulsions on droplet size and concentration. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **172**(1-3): 79-86.

Chanamai R. and McClements D. J. (2000c). Impact of weighting agents and sucrose on gravitational separation of beverage emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**(11): 5561-5565.

Chung W.-L., Chen J.-J. and Su H.-M. (2008). Fish oil supplementation of control and (n-3) fatty acid-deficient male rats enhances reference and working memory performance and increases brain regional docosahexaenoic acid levels. *Journal of Nutrition* **138**(6): 1165-1171.

Coello A., Meijide F., Núñez E. R. and Tato J. (1996). Aggregation behavior of bile salts in aqueous solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **85**(1): 9-15.

Cohen D. E. and Carey M. C. (1990). Rapid (1 hour) high performance gel filtration chromatography resolves coexisting simple micelles, mixed micelles, and vesicles in bile. *Journal of Lipid Research* **31**(11): 2103-2112.

Collins B. E., Dancil K. P. S., Abbi G. and Sailor M. J. (2002). Determining protein size using an electrochemically machined pore gradient in silicon. *Advanced Functional Materials* **12**(3): 187-191.

Coti Bertrand P., O'Kusky J. R. and Innis S. M. (2006). Maternal dietary (n-3) fatty acid deficiency alters neurogenesis in the embryonic rat brain. *The Journal of Nutrition* **136**(6): 1570-1575.

Coupland J. N. and McClements D. J. (1996). Lipid oxidation in food emulsions. *Trends in Food Science & Technology* **7**(3): 83-91.

Dangour A. D., Allen E., Elbourne D., Fasey N., Fletcher A. E., Hardy P., Holder G. E., Knight R., Letley L., Richards M. and Uauy R. (2010). Effect of 2-y n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation on cognitive function in older people: a randomized, double-blind, controlled trial. *American Journal of Clinical Nutrition* **91**(6): 1725-1732.

Davis J. S. and Wu X. (2012). Current state and future challenges of chemoprevention. *Discovery Medicine* **13**(72): 385-390.

Dawson P. A., Shneider B. L. and Hofmann A. F. (2006). Bile formation and the enterohepatic circulation. In *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Johnson L. R., Barret K. E., Ghishan F. K., Merchant J. L., Said H. M. and Wood J. D. 4th ed. Academic Press, Burlington Vermont: pp. 1437-1462.

Degen L. P. and Phillips S. F. (1996). Variability of gastrointestinal transit in healthy women and men. *Gut* **39**(2): 299-305.

DeNigris S. J., Hamosh M., Kasbekar D. K., Lee T. C. and Hamosh P. (1988). Lingual and gastric lipases: species differences in the origin of prepancreatic digestive lipases and in the localization of gastric lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **959**(1): 38-45.

Denny P., Hagen F. K., Hardt M., Liao L., Yan W., Arellanno M., Bassilian S., Bedi G. S., Boontheung P., Cociorva D., Delahunty C. M., Denny T., Dunsmore J., Faull K. F., Gilligan J., Gonzalez-Begne M., Halgand F. d. r., Hall S. C., Han X., Henson B., Hewel J., Hu S., Jeffrey S., Jiang J., Loo J. A., Ogorzalek Loo R. R., Malamud D., Melvin J. E., Miroshnychenko O., Navazesh M., Niles R., Park S. K., Prakobphol A., Ramachandran P., Richert M., Robinson S., Sondej M., Souda P., Sullivan M. A., Takashima J., Than S., Wang J., Whitelegge J. P., Witkowska H. E., Wolinsky L., Xie Y., Xu T., Yu W., Ytterberg J., Wong D. T., Yates J. R. and Fisher S. J. (2008). The proteomes of human parotid and submandibular/sublingual gland salivas collected as the ductal secretions. *Journal of Proteome Research* **7**(5): 1994-2006.

Dickinson E. (1992). An introduction to food colloids. *Oxford:Oxford University press*: 216p.

Dickinson E. and McClements D. J. (1995). Advances in food colloids. *London:Chapman and Hall*: 333p.

Dickinson E. and Stainsby G. (1982). Colloids in foods. *London:Applied Science Publishers*: 750p.

Drago S. R., Panouillé M., Saint-Eve A., Neyraud E., Feron G. and Souchon I. (2011). Relationships between saliva and food bolus properties from model dairy products. *Food Hydrocolloids* **25**(4): 659-667.

Dressman J. B., Berardi R. R., Dermentzoglou L. C., Russell T. L., Schmaltz S. P., Barnett J. L. and Jarvenpaa K. M. (1990). Upper gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women. *Pharmaceutical Research* **7**(7): 756-761.

Duan R.-D. (2000). Enzymatic aspects of fat digestion in the gastrointestinal tract. In *Fat digestion and absorption*. Christophe A. B. and DeVriese S. AOCS Press, Champaign illinois: pp. 25-46.

Dyerberg J., Bang H. O., Stoffersen E., Moncada S. and Vane J. R. (1978). Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? *The Lancet* **312**(8081): 117-119.

Edgar W. M. (1990). Saliva and dental health. Clinical implications of saliva: report of a consensus meeting. *British Dental Journal* **169**(3-4): 96-98.

Egelhaaf S. U. and Schurtenberger P. (1999). Micelle-to-vesicle transition: a time-resolved structural study. *Physical Review Letters* **82**(13): 2804 2807.

Esterbauer H. (1993). Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *The American Journal of Clinical Nutrition* **57**(5): 779S-785S.

Esterbauer H., Schaur R. J. and Zollner H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology & Medicine* **11**(1): 81-128.

Esterbauer H., Zollner H. and Schaur R. J. (1990). Aldehydes formed by lipid peroxidation: mecanisms of formation, occurence and determination. In *Membrane lipid peroxidation*. Vigo-Pelfrey C., editor. CRC Press, Boca Raton, FL: pp. 239-268.

Evans D. F., Pye G., Bramley R., Clark A. G., Dyson T. J. and Hardcastle J. D. (1988). Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects. *Gut* **29**(8): 1035-1041.

Fatouros D. G., Walrand I., Bergenstahl B. and Müllertz A. (2009). Colloidal structures in media simulating intestinal fed state conditions with and without lipolysis products. *Pharmaceutical Research* **26**(2): 361-374.

Favé G., Coste T. C. and Armand M. (2004). Physicochemical properties of lipids: new strategies to manage fatty acid bioavailability. *Cellular and Molecular Biology* **50**(7): 815-831.

Fetterman J. W. J. and Zdanowicz M. M. (2009). Therapeutic potential of n-3 polyunsaturated fatty acids in disease. *American Journal of Health-System Pharmacy* **66**(13): 1169-1179.

Fologea D., Ledden B., McNabb D. S. and Li J. (2007). Electrical characterization of protein molecules by a solid-state nanopore. *Applied Physics Letters* **91**(5): 053901-1–053901-3.

Frankel E. N. (1998). Lipid oxidation. *The Oil Press, Dundee, Scotland*: 300p.

Frankel E. N. (2005). *Lipid oxidation*, 2nd Ed ed. The Oily Press : Bridgwate, England. 470 p

Gao Q., Niti M., Feng L., Yap K. and Ng T. (2011). Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplements and cognitive decline: singapore longitudinal aging studies. *The Journal of Nutrition, Health & Aging* **15**(1): 32-35.

Garaiova I., Guschina I. A., Plummer S. F., Tang J., Wang D. and Plummer N. T. (2007). A randomised cross-over trial in healthy adults indicating improved absorption of omega-3 fatty acids by pre-emulsification. *Nutrition Journal* **6**(4): 1-9.

Garrett D. A., Failla M. L. and Sarama R. J. (1999). Development of an *in vitro* digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**(10): 4301-4309.

Garti N. (1997). Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food applications. *LWT - Food Science and Technology* **30**(3): 222-235.

Genot C., Berton C. and Ropers M.-H. (in press). The role of the interfacial layer and emulsifying proteins in the oxidation in oil-in-water emulsions. In *Lipid Oxidation: Challenges in Food Systems*. Logan A., Nienaber U. and Pan X. AOCS Press, 2710 S. Boulder, Urbana, IL 61802-6996 USA: pp. 177-210.

Genot C., Meynier A., Riaublanc A. and Chobert J. M. (2003). Protein alterations due to lipid oxidation in multiphase systems. In *Lipid oxidation pathways*. Kamal-Eldin A., editor. AOCS Press, Champaign Illinois: pp. 265-292.

Gil A., Serra-Majem L., Calder P. C. and Uauy R. (2012). Systematic reviews of the role of omega-3 fatty acids in the prevention and treatment of disease. *British Journal of Nutrition* **107**: S1-S2.

GISSI-Prevenzione Investigators (1999). Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. *The Lancet* **354**(9177): 447-455.

Gohtani S., Sirendi M., Yamamoto N., Kajikawa K. and Yamano Y. (1999). Effect of droplet size on oxidation of docosahexaenoic acid in emulsion system. *Journal of Dispersion Science and Technology* **20**(5): 1319-1325.

Golding M., Wooster T. J., Day L., Xu M., Lundin L., Keogh J. and Clifton P. (2011). Impact of gastric structuring on the lipolysis of emulsified lipids. *Soft Matter* **7**(7): 3513-3523.

Gonzalez M., Schemmel R., Dugan L., Gray J. and Welsch C. (1993). Dietary fish oil inhibits human breast carcinoma growth: A function of increased lipid peroxidation. *Lipids* **28**(9): 827-832.

Gorelik S., Kohen R., Ligumsky M. and Kanner J. (2007). Saliva plays a dual role in oxidation process in stomach medium. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **458**(2): 236-243.

Gorelik S., Lapidot T., Shaham I., Granit R., Ligumsky M., Kohen R. and Kanner J. (2005). Lipid peroxidation and coupled vitamin oxidation in simulated and human gastric fluid inhibited by dietary polyphenols: health implications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 3397-3402.

Gorelik S., Ligumsky M., Kohen R. and Kanner J. (2008). The stomach as a "Bioreactor": when red meat meets red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**(13): 5002-5007.

Grau A., Guardiola F., Boatella J., Barroeta A. and Codony R. (2000). Measurement of 2-thiobarbituric acid values in dark chicken meat through derivative spectrophotometry: influence of various parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**(4): 1155-1159.

Grootveld M., Atherton M. D., Sheerin A. N., Hawkes J., Blake D., Richens T. E., Silwood C. J., Lunch E. and Claxson A. W. D. (1998). *In vivo* absorption, metabolism, and urinary excretion of a,ß-unsaturated aldehydes in experimental animals. *Journal of Clinical Investigation* **101**: 1210-1218.

Hamosh M. (2000). Preduodenal fat digestion. In *Fat digestion and absorption*. Christophe A. B. and DeVriese S. AOCS Press, Champaign illinois: pp. 1-12.

Hara A. and Radin N. S. (1978). Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry* **90**(1): 420-426.

Harris W. S., Connor W. E., Illingworth D. R., Rothrock D. W. and Foster D. M. (1990). Effects of fish oil on VLDL triglyceride kinetics in humans. *Journal of Lipid Research* **31**(9): 1549-1558.

Hassan E. E. and Gallo J. M. (1990). A simple rheological method for the in vitro assessment of mucin-polymer bioadhesive bond strength. *Pharmaceutical Research* **7**(5): 491-495.

Hernell O., Staggers J. E. and Carey M. C. (1990). Physico-chemical behavior of dietary and bilary lipids during intestinal digestion and absorption.2. Phase analysis and aggregation states of luminal lipids during duodenal fat ingestion in healthy adult human beings. *Biochemistry* **29**: 2041-2056.

Herrero-Barbudo M. C., Granado-Lorencio F., Blanco-Navarro I., Perz-Sacristan B. and Olmedilla-Alonso B. (2009). Applicability of an in vitro model to assess the bioaccessibility of vitamins A and E from fortified commercial milk. *International Dairy Journal* **19**(1): 64-67.

Hillman K., Whyte A. L. and Stewart C. S. (1993). Dissolved oxygen in the porcine gastrointestinal tract. *Letters in Applied Microbiology* **16**(6): 299-302.

Hoebler C., Guillon F., Fardet A., Cherbut C. and Barry J.-L. (1998). Gastrointestinal or simulated *in vitro* digestion changes dietary fibre properties and their fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **77**(3): 327-333.

Högyes E., Nyakas C., Kiliaan A., Farkas T., Penke B. and Luiten P. G. M. (2003). Neuroprotective effect of developmental docosahexaenoic acid supplement against excitotoxic brain damage in infant rats. *Neuroscience* **119**(4): 999-1012.

Horn A. F., Nielsen N. S. and Jacobsen C. (2012). Iron-mediated lipid oxidation in 70% fish oil-in-water emulsions: effect of emulsifier type and pH. *International Journal of Food Science & Technology* **47**(5): 1097-1108.

Hur S. J., Decker E. A. and McClements D. J. (2009). Influence of initial emulsifier type on microstructural changes occurring in emulsified lipids during *in vitro* digestion. *Food Chemistry* **114**(1): 253-262.

Innis S. M. and Friesen R. W. (2008). Essential n-3 fatty acids in pregnant women and early visual acuity maturation in term infants. *American Journal of Clinical Nutrition* **87**(3): 548-557.

Iverson S. J., Kirk C. L., Hamosh M. and Newsome J. (1991). Milk lipid digestion in the neonatal dog: the combined actions of gastric and bile salt stimulated lipases. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism* **1083**(1): 109-119.

Jenkins P. and Snowden M. (1996). Depletion flocculation in colloidal dispersions. *Advances in Colloid and Interface Science* **68**: 57-96.

Jin G., He L., Zhang J., Yu X., Wang J. and Huang F. (2012). Effects of temperature and NaCl percentage on lipid oxidation in pork muscle and exploration of the controlling method using response surface methodology (RSM). *Food Chemistry* **131**(3): 817-825.

Jones P. J. H. and Papamandjaris A. A. (2001). Lipids: cellular metabolism. In *Present Knowledge in Nutrition*. Bowman B. A. and Russell R. M. 8 ed. ILSI Press, Washington, D.C.: pp. 104-114.

Kabalnov A. S. and Shchukin E. D. (1992). Ostwald ripening theory: applications to fluorocarbon emulsion stability. *Advances in Colloid and Interface Science* **38**: 69-97.

Kalantzi L., Goumas K., Kalioras V., Abrahamsson B., Dressman J. and Reppas C. (2006). Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. *Pharmaceutical Research* **23**(1): 165-176.

Kamal-Eldin A. and Appelqvist L.-A. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* **31**(7): 671-701.

Kamal-Eldin A. and Min D. B. (2009) *Lipid oxydation pathways*. Urbana, Illinois: AOCS Press.

Kanner J. and Lapidot T. (2001). The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Radical Biology & Medecine* **31**(11): 1388-1395.

Kasbi Chadli F., Andre A., Prieur X., Loirand G., Meynier A., Krempf M., Nguyen P. and Ouguerram K. (2012). n-3 PUFA prevent metabolic disturbances associated with obesity and improve endothelial function in golden Syrian hamsters fed with a high-fat diet. *British Journal of Nutrition* **107**(9): 1305–1315.

Kaur G., Cameron-Smith D., Garg M. and Sinclair A. J. (2011). Docosapentaenoic acid (22:5n-3): a review of its biological effects. *Progress in Lipid Research* **50**(1): 28-34.

Kolanowski W., Swiderski F. and Berger S. (1999). Possibilities of fish oil application for food products enrichment with omega-3 PUFA. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **50**(1): 39-49.

Koskas J. P., Cillard J. and Cillard P. (1984). Autoxidation of linoleic acid and behavior of its hydroperoxides with and without tocopherols. *Journal of the American Oil Chemists Society* **61**(9): 1466-1469.

Kossena G. A., Boyd B. J., Porter C. J. and Charman W. N. (2003). Separation and characterization of the colloidal phases produced on digestion of common formulation lipids and assessment of their impact on the apparent solubility of selected poorly water-soluble drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **92**(3): 634-648.

Kwak S., Myung S., Lee Y., Seo H. and Korean Meta-Analysis Study Group (2012). Efficacy of omega-3 fatty acid supplements (eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid) in the secondary prevention of cardiovascular disease: a meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *Archives of Internal Medicine* **172**(9): 686-694.

Lee S., Müller M., Rezwan K. and Spencer N. D. (2005). Porcine gastric mucin (PGM) at the water/poly(dimethylsiloxane) (PDMS) interface: influence of pH and ionic strength on its conformation, adsorption, and aqueous lubrication properties. *Langmuir* **21**(18): 8344-8353.

Leng J., Egelhaaf S. U. and Cates M. E. (2003). Kinetics of the micelle-to-vesicle transition: aqueous lecithin-bile salt mixtures. *Biophysical Journal* **85**(3): 1624–1646.

Lesieur P., Kiselev M. A., Barsukov L. I. and Lombardo D. (2000). Temperature-induced micelle to vesicle transition: kinetic effects in the DMPC/NaC system. *Journal of Applied Crystallography* **33**: 623-627.

Let M. B., Jacobsen C., Sorensen A. D. M. and Meyer A. S. (2007). Homogenization conditions affect the oxidative stability of fish oil enriched milk emulsions: lipid oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**(5): 1773-1780.

Lethuaut L., Metro F. and Genot C. (2002). Effect of droplet size on lipid oxidation rates of oil-in-water emulsions stabilized by protein. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **79**(5): 425-430.

Li J., Ye A., Lee S. J. and Singh H. (2012). Influence of gastric digestive reaction on subsequent *in vitro* intestinal digestion of sodium caseinate-stabilized emulsions. *Food & Function* **3**(3): 320-326.

Lim G. P., Calon F., Morihara T., Yang F., Teter B., Ubeda O., Salem N. J., Frautschy S. A. and Cole G. M. (2005). A diet enriched with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model. *Journal of Neuroscience* **25**(12): 3032-3040.

Lindahl A., Ungell A.-L., Knutson L. and LennernÃ¤s H. (1997). Characterization of fluids from the stomach and proximal jejunum in men and women. In *Pharmaceutical Research*, pp. 497-502: Springer Netherlands.

Lonergan P. E., Martin D. S., Horrobin D. F. and Lynch M. A. (2004). Neuroprotective actions of eicosapentaenoic acid on lipopolysaccharide-induced dysfunction in rat hippocampus. *Journal of Neurochemistry* **91**(1): 20-29.

Long E. K., Murphy T. C., Leiphon L. J., Watt J., Morrow J. D., Milne G. L., Howard J. R. H. and Picklo J. M. S. (2008). Trans-4-hydroxy-hexenal is a neurotoxic product of docosahexaenoic (22:6; n-3) acid Oxidation. *Journal of Neurochemistry* **105**(3): 714-724.

Lorrain B., Dangles O., Genot C. and Dufour C. (2010). Chemical modeling of heme-induced lipid oxidation in gastric conditions and inhibition by dietary polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**(1): 676-683.

Lorrain B., Dangles O., Loonis M., Armand M. and Dufour C. (2012). Dietary iron-initiated lipid oxidation and its inhibition by polyphenols in gastric conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**(36): 9074-9081.

Lowe M. E. (1997). Structure and function of pancreatic lipase and colipase. *Annual Review of Nutrition* **17**(1): 141-158.

Lowe M. E. (2002). The triglyceride lipases of the pancreas. *Journal of Lipid Research* **43**(12): 2007-2016.

Macierzanka A., Sancho A. I., Mills E. N. C., Rigby N. M. and Mackie A. R. (2009). Emulsification alters simulated gastrointestinal proteolysis of β-casein and β-lactoglobulin. *Soft Matter* **5**: 538-550.

Malaki Nik A., Wright A. J. and Corredig M. (2011). Impact of interfacial composition on emulsion digestion and rate of lipid hydrolysis using different in vitro digestion models. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **83**(2): 321-330.

Marchioli R., Barzi F., Bomba E., Chieffo C. D., Gregorio D. D., Mascio R., Franzosi M. G., Geraci E., Levantesi G., Maggioni A., Mantini L., Marfisi R. M., Mastrogiuseppe G., Mininni N., Nicolosi G., Santini M., Schweiger C., Tavazzi L., Tognoni G., Tucci C., Valagussa F. and Investigators G.-P. (2002). Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: time-course analysis of the results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione. *Circulation.* **105**(16): 1897-1903.

Marciani L., Faulks R., Wickham M. S., Bush D., Pick B., Wright J., Cox E. F., Fillery-Travis A., Gowland P. A. and Spiller R. C. (2009). Effect of intragastric acid stability of fat emulsions on gastric emptying, plasma lipid profile and postprandial satiety. *British Journal of Nutrition* **101**(6): 919-928.

Marciani L., Wickham M. S. J., Bush D., Faulks R. M., Wright J., Fillery-Travis A. J., Spiller R. C. and Gowland P. A. (2006). Magnetic resonance imaging of the behaviour of oil-in-water emulsions in the gastric lumen of man. *British Journal of Nutrition* **95**: 331-339.

Marieb E. N. (1999). *Anatomie et physiologie humaines*. Québec, Canada: De Boeck. 1194p.

Markwell M. A., Haas S. M., Bieber L. L. and Tolbert N. E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry* **87**(1): 206-210.

McClements D. J. (1999). *Food emulsions : principles, practice and techniques*. Boca Raton: CRC Press. 392p.

McClements D. J. (2005). *Food emulsions: principles, practice and techniques*, 2 ed. Boca Raton, Florida USA CRC Press. 609p.

McClements D. J. and Decker E. A. (2000). Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science* **65**(8): 1270 - 1282.

Mendes R., Cardoso C. and Pestana C. (2009). Measurement of malondialdehyde in fish: a comparison study between HPLC methods and the traditional spectrophotometric test. *Food Chemistry* **112**(4): 1038-1045.

Metcalf A. M., Phillips S. F., Zinsmeister A. R., MacCarty R. L., Beart R. W. and Wolff B. G. (1987). Simplified assessment of segmental colonic transit. *Gastroenterology* **92**(1): 40-47.

Meunier P., Minaire Y. and Lambert R. (1988). *La digestion*, 2 ed. Paris, France: Simep. 53-71.

Meynier A., Genot C. and Gandemer G. (1999). Oxidation of muscle phospholipids in relation to their fatty acid composition with emphasis on volatile compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**(6): 797-804.

Michalski M. C., Calzada C., Makino A., Michaud S. and Guichardant M. (2008). Oxidation products of polyunsaturated fatty acids in infant formulas compared to human milk: a preliminary study. *Molecular Nutrition & Food Research* **52**(12): 1478-1485.

Miled N., Canaan S., Dupuis L., Roussel A., Rivière M., Carrière F., de Caro A., Cambillau C. and Verger R. (2000). Digestive lipases: from three-dimensional structure to physiology. *Biochimie* **82**(11): 973-986.

Miyashita K., Nara E. and Ota T. (1993). Oxidative stability of polyunsaturated fatty acids in an aqueous solution. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **57**(10): 1638-1640.

Molendi-Coste O., Legry V. and Leclercq I. A. (2011). Why and how meet n-3 PUFA dietary recommendations? *Gastroenterology Research and Practice* **2011**: 11p.

Mori T. A., Watts G. F., Burke V., Hilme E., Puddey I. B. and Beilin L. J. (2000). Differential effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on vascular reactivity of the forearm microcirculation in hyperlipidemic, overweight men. *Circulation* **102**(11): 1264-1269.

Morris M. C., Evans D. A., Bienias J. L., Tangney C. C., Bennett D. A., Wilson R. S., Aggarwal N. and Schneider J. (2003). Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident alzheimer disease. *Archives of Neurology* **60**(7): 940-946.

Morrison W. R. and Smith L. M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *Journal of Lipid Research* **5**(4): 600-608.

Mozaffarian D., Lemaitre R. N., Kuller L. H., Burke G. L., Tracy R. P., Siscovick D. S. and Study. C. H. (2003). Cardiac benefits of fish consumption may depend on the type of fish meal consumed: the cardiovascular health study. *Circulation* **107**(10): 1372-1377.

Mukhopadhyay S. and Maitra U. (2004). Chemistry and biology of bile acids. *Current Science* **87**(12): 1666-1683.

Mun S., Decker E., Park Y., Weiss J. and McClements D. (2006). Influence of interfacial composition on *in vitro* digestibility of emulsified lipids: potential mechanism for chitosan's ability to inhibit fat digestion. *Food Biophysics* **1**(1): 21-29.

Muthayya N. M. (2002). Digestive system. In *Human physiology*. 3rd ed. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd New Delhi, India: pp. 121-167.

Nagyová A., Krajcovicová-Kudlácková M. and Klvanová J. (2001). LDL and HDL oxidation and fatty acid composition in vegetarians. *Annals of Nutrition and Metabolism* **45**(4): 148-151.

Nakashima T., Anno T., Kanda H., Sato Y., Kuroi T., Fujii H., Nagadome S. and Sugihara G. (2002). Potentiometric study on critical micellization concentrations (CMC) of sodium salts of bile acids and their amino acid derivatives. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **24**(2): 103-110.

Nakaya K., Ushio H., Matsukawa S., Shimizu M. and Ohshima T. (2005). Effects of droplet size on the oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Lipids* **40**(5): 501-507.

Natalini B., Sardella R., Camaioni E., Gioiello A. and Pellicciari R. (2007). Correlation between CMC and chromatographic index: simple and effective evaluation of the hydrophobic/hydrophilic balance of bile acids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **388**(8): 1681-1688.

Neyraud E., Palicki O., Schwartz C., Nicklaus S. and Feron G. (2012). Variability of human saliva composition: possible relationships with fat perception and liking. *Archives of Oral Biology* **57**(5): 556-566.

Niedernhofer L. J., Daniels J. S., Rouzer C. A., Greene R. E. and Marnett L. J. (2003). Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *Journal of Biological Chemistry* **278**(33): 31426-31433.

Oarada M., Miyazawa T. and Kaneda T. (1986). Distribution of ^{14}C after oral administration of (U-^{14}C)labeled methyl linoleate hydroperoxides and their secondary oxidation products in rats. *Lipids* **21**(2): 150-154.

Oomen A. G., Rompelberg C. J. M., Bruil M. A., Dobbe C. J. G., Pereboom D. P. K. H. and Sips A. J. A. M. (2003). Development of an *in Vitro* digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **44**(3): 0281-0287.

Packer J. E., Slater T. F. and Willson R. L. (1979). Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* **278**(5706): 737-738.

Pafumi Y., Lairon D., Lechene de la Porte P., Jubel C., Storch J., Mamosh M. and Armand M. (2002). Mechanisms of inhibition of triacylglkycerol hydrolysis by human gastric lipase. *The Journal of Biological Chemistry* **277**(31): 28070-28079.

Phillipson B. E., Rothrock D. W., Connor W. E., Harris W. S. and Illingworth D. R. (1985). Reduction of plasma lipids, lipoproteins, and apoproteins by dietary fish oils in patients with hypertriglyceridemia. *New England Journal of Medicine* **312**(19): 1210-1216.

Pierre F., Peiro G., Taché S., Cross A. J., Bingham S. A., Gasc N., Gottardi G., Corpet D. E. and Guéraud F. (2006). New marker of colon cancer risk associated with heme intake: 1,4-dihydroxynonane mercapturic acid. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **15**(11): 2274-2279.

Pinfield V. J., Dickinson E. and Povey M. J. W. (1997). Modeling of combined creaming and flocculation in emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science* **186**(1): 80-89.

Piper D. W. and Fenton B. H. (1965). pH stability and activity curves of pepsin with special reference to their clinical importance. *Gut* **6**(5): 506-508.

Porter N. A., Caldwell S. E. and Mills K. A. (1995). Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* **30**(4): 277-290.

Proano M., Camilleri M., Phillips S. F., Brown M. L. and Thomforde G. M. (1990). Transit of solids through the human colon: regional quantification in the unprepared bowel. *American journal of physiology - gastrointestinal and liver physiology* **258**(6): G856-G862.

Pye G., Evans D. F., Ledingham S. and Hardcastle J. D. (1990). Gastrointestinal intraluminal pH in normal subjects and those with colorectal adenoma or carcinoma. *Gut* **31**(12): 1355-1357.

Quinn J. F., Raman R., Thomas R. G., Yurko-Mauro K., Nelson E. B., Van Dyck C., Galvin J. E., Emond J., Jack C. R. J., Weiner M., Shinto L. and Aisen P. S. (2010). Docosahexaenoic acid supplementation and cognitive decline in Alzheimer disease: a randomized trial. *Journal of the American Medical Association* **304**(17): 1903-1911.

Roda A., Hofmann A. F. and Mysels K. J. (1983). The influence of bile salt structure on self-association in aqueous solutions. *Journal of Biological Chemistry* **258**(10): 6362-6370.

Rose D. P., Connolly J. M., Rayburn J. and Coleman M. (1995). Influence of diets containing eicosapentaenoic or docosahexaenoic acid on growth and metastasis of breast cancer cells in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute* **87**(8): 587-592.

Sarda L. and Desnuelle P. (1958). Actions of pancreatic lipase on esters in emulsions. *Biochimica et Biophysica Acta* **30**(3): 513-521.

Sarkar A., Goh K. K. T. and Singh H. (2010a). Properties of oil-in-water emulsions stabilized by [beta]-lactoglobulin in simulated gastric fluid as influenced by ionic strength and presence of mucin. *Food Hydrocolloids* **24**(5): 534-541.

Sarkar A., Goth K. K. T., Singh R. P. and Singh H. (2009). Behaviour of an oil-in-water emulsion stabilized by β-lactoglobulin in an *in vitro* gastric model. *Food Hydrocolloids* **23**(6): 1563-1569.

Sarkar A., Horne D. S. and Singh H. (2010b). Interactions of milk protein-stabilized oil-in-water emulsions with bile salts in a simulated upper intestinal model. *Food Hydrocolloids* **24**(2-3): 142-151.

Schaich K. M. (2012). Thinking outside the classical chain reaction box of lipid oxidation. *Lipid Technology* **24**(3): 55-58.

Seljeskog E., Hervig T. and Mansoor M. A. (2006). A novel HPLC method for the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). A comparison with a commercially available kit. *Clinical Biochemistry* **39**(9): 947-954.

Sinclair H. M. (1980). Prevention of coronary heart disease: the role of essential fatty acids. *Postgraduate Medical Journal* **56**(658): 579–584.

Sinclair H. M. (1956). Deficiency of essential fatty acids and atherosclerosis, etcetera. *Lancet* **270**(6919): 381-3.

Singh H., Ye A. and Horne D. (2009). Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. *Progress in Lipid Research* **48**(2): 92-100.

Siscovick D. S., Raghunathan T. E., King I., Weinmann S., Wicklund K. G., Albright J., Bovbjerg V. E., Arbogast P., Smith H., Kushi L. H., Cobb L. A., Copass M. K., Psaty B. M., Lemaitre R., Retzlaff B., Childs M. and Knopp R. H. (1995). Dietary intake and cell membrane levels of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of primary cardiac arrest. *Journal of the American Medical Association* **274**(17): 1363-1367.

Skoczylas T., Sarosiek I., Sostarich S., McElhinney C., Durham S. and Sarosiek J. (2003). Significant enhancement of gastric mucin content after rabeprazole administration: its potential clinical significance in acid-related disorders. *Digestive Diseases and Sciences* **48**(2): 322-328.

Smith W., Mitchell P. and Leeder S. R. (2000). Dietary fat and fish intake and age-related maculopathy. *Archives of Ophthalmology* **118**(3): 401-404.

Solans C., Izquierdo P., Nolla J., Azemar N. and Garcia-Celma M. J. (2005). Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **10**(3-4): 102-110.

Son K. and Alkan H. (1989). Liposomes prepared dynamically by interactions between bile salt and phospholipid molecules. *Biochimica et Biophysica Acta* **981**(2): 288-294.

Stephen J. L., Brian P. F. and Gordon G. F. (1978). Enhancement of the viscosity of mucin by serum albumin. *Biochemical Journal* **175**: 565-571.

Stone B. G., Larsen L. J., Knoll D. A., Bloomfield V. A. and Duane W. C. (1992). Separation of bile vesicles and micelles by gel filtration chromatography: the importance of the intermicellar bile salt concentration. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **119**(5): 557-565.

Surh J. and Kwon H. (2003). Simultaneous determination of 4-hydroxy-2-alkenals, lipid peroxidation toxic products. *Food Additives and Contaminants* **20**(4): 325-330.

Tagliazucchi D., Verzelloni E. and Conte A. (2010). Effect of Dietary Melanoidins on Lipid Peroxidation during Simulated Gastric Digestion: Their Possible Role in the Prevention of Oxidative Damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**(4): 2513-2519.

Terao J. (2001). Factors affecting the oxidative stability of emulsified oil and membranous phospholipids. *Journal of Oleo Science* **50**(5): 393-397.

Terao J., Ingemansson T., Ioku K., Yuki H. and Ito Y. (1995). Effects of rat bile-pancreatic juice on Fe^{2+} induced peroxidation of phospholipids. *Bioscience Biotechnology and Agrochemistry* **59**(1): 55-58.

Tesoriere L., Butera D., Gentile C. and Livrea M. A. (2007). Bioactive components of caper (Capparis spinosa L.) from Sicily and antioxidant effects in a red meat simulated gastric digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**(21): 8465-8471.

Thakkar S. K., Maziya-Dixon B., Dixon A. G. O. and Failla M. L. (2007). {beta}-carotene micellarization during *in vitro* digestion and uptake by caco-2 cells is directly proportional to {beta}-carotene content in different genotypes of cassava. *Journal of Nutrition* **137**(10): 2229-2233.

Trautwein E. (2001). n-3 fatty acids - physiological and technical aspects for their use in food. *European Journal of Lipid Science and Technology* **103**(1): 45-55.

Tso P. (2000). Overview of digestion and absorption. In *Biochemical and physiological aspects of human nutrition*. Crissinger K. D. and Stipanuk M. H. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania: W.B.: pp. 75-90.

Uchida T., Gotoh N. and Wada S. (2002). Method for analysis of 4-hydroxy-2-(E)-nonenal with solid phase microextraction. *Lipids* **37**(6): 621-626.

Van Aken G. A., Bomhof E., Zoet F. D., Verbeek M. and Oosterveld A. (2011). Differences in *in vitro* gastric behaviour between homogenized milk and emulsions stabilised by Tween 80, whey protein, or whey protein and caseinate. *Food Hydrocolloids* **25**(4): 781-788.

Van Kuijk F. J. G. M., Holte L. L. and Dratz E. A. (1990). 4-Hydroxyhexenal: a lipid peroxidation product derived from oxidized docosahexaenoic acid. *Biochimica et Biophysica Acta* **1043**(1): 116-118.

Verzelloni E., Tagliazucchi D. and Conte A. (2010). From balsamic to healthy: Traditional balsamic vinegar melanoidins inhibit lipid peroxidation during simulated gastric digestion of meat. *Food and Chemical Toxicology* **48**(8-9): 2097-2102.

Vingerhoeds M. H., Blijdenstein T. B. J., Zoet F. D. and van Aken G. A. (2005). Emulsion flocculation induced by saliva and mucin. *Food Hydrocolloids* **19**(5): 915-922.

Voho A., Chen J., Kumar M., Rao M. and Wetmur J. (2006). Lipase expression and activity in saliva in a healthy population. *Epidemiology* **17**(6): S336.

Waraho T., Cardenia V., Rodriguez-Estrada M. T., McClements D. J. and Decker E. A. (2009). Prooxidant mechanisms of free fatty acids in stripped soybean oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**(15): 7112-7117.

Wu M., Harvey K. A., Ruzmetov N., Welch Z. R., Sech L., Jackson K., Stillwell W., Zaloga G. P. and Siddiqui R. A. (2005). Omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate breast cancer growth through activation of a neutral sphingomyelinase-mediated pathway. *International Journal of Cancer* **117**(3): 340-348.

Yazu K., Yamamoto Y., Ukegawa K. and Niki E. (1996). Mechanism of lower oxidizability of eicosapentaenoate than linoleate in aqueous micelles. *Lipids* **31**(3): 337-340.

Yokoyama M., Origasa H., Matsuzaki M., Matsuzawa Y., Saito Y., Ishikawa Y., Oikawa S., Sasaki J., Hishida H., Itakura H., Kita T., Kitabatake A., Nakaya N., Sakata T., Shimada K., Shirato K. and Investigators J. E. l. i. s. J. (2007). Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. *Lancet* **369**(9567): 1090-1098.

Zhou Y. and Raphael R. M. (2007). Solution pH alters mechanical and electrical properties of phosphatidylcholine membranes: relation between interfacial electrostatics, intramembrane potential, and bending elasticity. *Biophysical Journal* **92**(7): 2451-2462.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Potential zêta des milieux digestifs témoins et essais issus de l'émulsion stabilisée par les tensioactifs

	Potentiel zêta (mV)	
	Essais	Témoins
G0	/	1,4 ± 0,1
G30	16,6 ± 1,0	20,9 ± 2,9
G60	15,0 ± 0,3	29,8 ± 1,1
I0	-34,6 ± 0,5	-7,9 ± 0,6
I30	-42,4 ± 0,9	-16,3 ± 0,6
I60	-37,2 ± 1,2	-20,5 ± 2,5
I90	-36,4 ± 1,1	-17,9 ± 0,4
I120	-38,3 ± 0,7	-18,7 ± 3,8
Emulsion	-20,5 ± 0,8	

ANNEXE 2 : Profil granulométriques des émulsions d'huile de colza stabilisées par la SAB après ajustement du pH à 2,5 ou 4

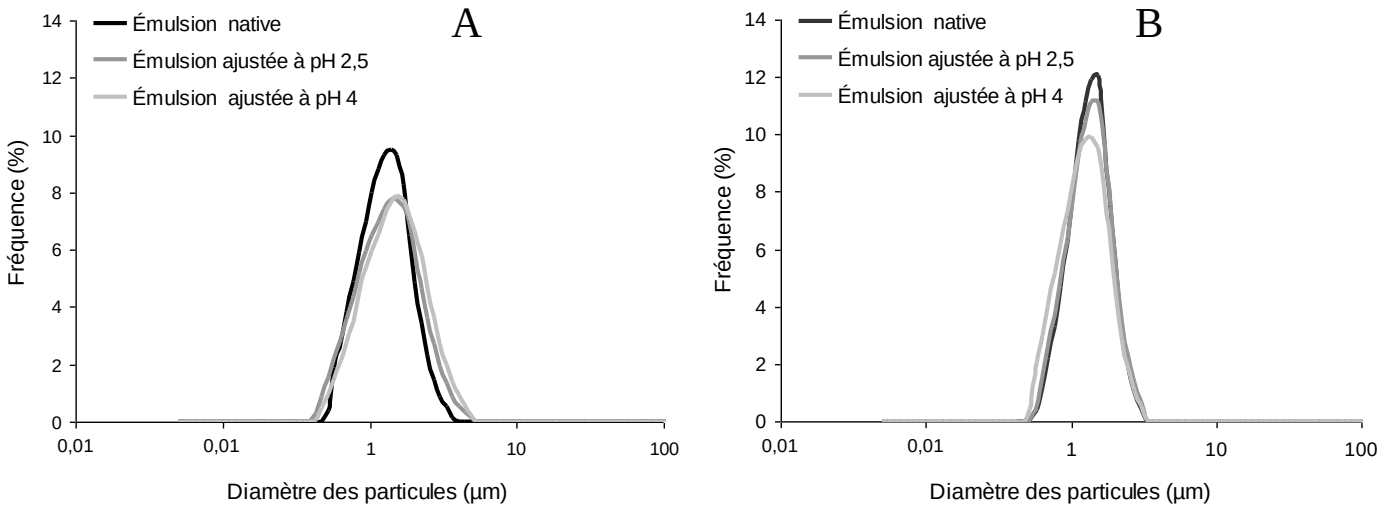


Figure 44 : Distribution de taille des gouttelettes lipidiques présentes dans les émulsions huile de colza-SAB 10% natives (A) ou après dilution au 1/10ème dans du SDS 1% (B), ajustées ou non à pH 2,5 ou 4

ANNEXE 3 : certificats d'autorisation d'expérimenter sur animaux vivants

PREFECTURE DU DEPARTEMENT DU RHÔNE

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE L'AGROALIMENTAIRE

Le Directeur départemental
de la protection des populations du Rhône

CERTIFICAT D'AUTORISATION D'EXPÉRIMENTER SUR ANIMAUX VIVANTS n° 69266257

Code Rural articles L. 214-3 et L 215-7, R.214-87 à R.214-112 et R. 215-10 relatifs aux expériences pratiquées sur les animaux vertébrés
Arrêté du 19 avril 1988 fixant les conditions d'attribution de l'autorisation de pratiquer des expériences sur les animaux

Identité du demandeur : **SOULAGE Christophe**

Adresse de l'établissement : **INSA**
20 avenue Albert Einstein
69621 Villeurbanne

agréé sous le n°A 69266 0501

Est autorisé à réaliser des expériences sur animaux vertébrés vivants dans les conditions suivantes :

DOMAINES D'ACTIVITÉ
Recherche fondamentale
Essais d'efficacité ou de toxicité des médicaments et d'autres substances biologiques et chimiques
Enseignement

TYPE DE PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX MIS EN ŒUVRE ET ESPÈCES ANIMALES UTILISÉES	
Administration de substances sur animaux vigiles	Souris, rats et lapins
Administration de substances sur animaux anesthésiés	
Examens cliniques sur animaux vigiles	
Examens cliniques sur animaux anesthésiés	
Prélèvement de substances sur animaux vigiles	
Prélèvement de substances sur animaux anesthésiés	
Euthanasie des animaux en vue d'examens et/ou de prélèvements	

Autorisation valable jusqu'au **5 juillet 2017**

Pour le directeur départemental de la protection des populations
Le responsable Pôle Élevages

Évelyne BOUVIER

Voir Informations importantes au verso

ANNEXE 4 : agrément de l'établissement d'expérimentation animale

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

PREFECTURE DU DEPARTEMENT DU RHÔNE

Direction départementale
de la protection des populations
du Rhône

Service Protection et santé
animales

245 rue Garibaldi
69422 Lyon cedex 03

Dossier suivi par : Evelyne Bouvier

à rappeler dans toute correspondance

Tél : 04 72 61 37 00
Fax : 04 72 61 37 24

Réf : SP1200234

INSA
Monsieur le Directeur
20 avenue A Einstein
69621 VILLEURBANNE cedex

Mél : ddpp@rhone.gouv.fr

Objet : Agrément d'établissement d'expérimentation animale

ARRETE
portant agrément d'un établissement d'expérimentation animale

Le Préfet de la zone de Défense Sud-Est, Préfet de la région Rhône-Alpes,
Préfet du Rhône,
Chevalier de la Légion d'Honneur

VU la directive du Conseil n°86/609/CEE du 24 novembre 1986, modifiée par la directive 2003/65/CE du 22 juillet 2003, concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des Etats membres relatives à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques ;

VU le code pénal et notamment ses articles 521-1 et 521-2 ;

VU le code rural et notamment ses articles L.214-3 et R.214-103 à R. 214-106 ;

VU le décret n° 97-34 du 15 janvier 1997 relatif à la déconcentration des décisions administratives individuelles ;

VU le décret n° 2001-486 du 6 juin 2001 portant publication de la Convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques, adoptée à Strasbourg le 18 mars 1986 et signée par la France le 2 septembre 1987 ;

VU l'arrêté interministériel du 19 avril 1988 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements d'expérimentation animale ;

VU la demande d'agrément présentée par le responsable d'établissement en date du 6 décembre 2010 ;

VU les rapports des visites d'inspection effectuées les 21 janvier 2011 et 21 février 2012 par le représentant du directeur départemental de la protection des populations ;

VU l'arrêté préfectoral n° 2010-6432 du 1er décembre 2010 portant délégation de signature à Monsieur Vincent MARSEILLE, directeur départemental de la protection des populations du Rhône ;

VU l'arrêté préfectoral n° 890 du 20 janvier 2012 portant subdélégation de signature à Monsieur André KLEIN, directeur départemental adjoint de la protection des populations du Rhône ;

SUR la proposition du directeur départemental de la protection des populations du Rhône ;

.../...

d

Article 1 : L'établissement désigné ci-après est agréé pour la réalisation d'expériences sur les animaux vertébrés vivants sous le numéro

n° A69266 0501
INSA
20 avenue A Einstein
69621 VILLEURBANNE Cedex

Article 2 : Cet agrément est limité aux expériences pratiquées dans les conditions suivantes :

DOMAINES D'ACTIVITE
Recherche fondamentale
Recherche zootechnique et médicale vétérinaire
Essais d'activité d'efficacité ou de toxicité des médicaments et d'autres substances biologiques et chimiques
Diagnostic
Contrôle de la qualité des denrées alimentaires
Enseignement

TYPES DE PROTOCOLES EXPERIMENTAUX MIS EN ŒUVRE	ESPECES ANIMALES UTILISEES
Administration de substances sur animaux vigiles	souris, rats et lapins
Administration de substances sur animaux anesthésiés	
Examens cliniques sur animaux vigiles	
Examens cliniques sur animaux anesthésiés	
Prélèvement de substances sur animaux vigiles	
Prélèvement de substances sur animaux anesthésiés	
Euthanasie des animaux en vue d'examens et/ou de prélèvements	

Article 3 : Le présent arrêté est accordé pour une durée de cinq ans à compter de la date de sa signature soit jusqu'au **2 mars 2017**. Il est renouvelable sur demande écrite du responsable de l'établissement ; il peut être suspendu ou retiré en cas de non-respect des dispositions réglementaires.

Article 4 : Tout changement lié à l'établissement doit être notifié au Préfet (Direction départementale de la protection des populations) par le responsable de l'établissement d'expérimentation animale.

Article 5 : Les bénéficiaires du présent agrément adresseront à la demande des services officiels les informations concernant le nombre d'animaux utilisés et le type des expériences par catégories sélectionnées.

Article 6 : Le présent arrêté annule et remplace l'arrêté préfectoral du 29 novembre 2006 portant agrément de l'établissement d'expérimentation animale.

Article 7 : Le secrétaire général de la préfecture, le directeur départemental de la protection des populations du Rhône sont chargés chacun en ce qui le concerne de l'exécution du présent arrêté .

Fait à Lyon, le 2 mars 2012

Pour le Préfet,
Et par délégation,
Le directeur départemental adjoint de la protection des populations

André KLEIN

Évolutions structurales et oxydation des lipides lors de la digestion in vitro d'émulsions modèles

Résumé

Les données récentes montrent que les bénéfices nutritionnels associés aux acides gras polyinsaturés n-3 dépendent du devenir des structures des lipides et de leur oxydation au cours de la digestion. L'objectif de cette thèse était de préciser l'importance de paramètres liés à la composition des milieux de digestion sur les évolutions des structures des lipides émulsifiés, la bioaccessibilité des acides gras, et leur oxydation. Après la mise au point de conditions de digestion in vitro basées sur l'analyse de la bibliographie et prenant en compte des contraintes liées aux échanges gazeux, des digestions gastro-intestinales ont été effectuées sur des émulsions stabilisées par une protéine ou des tensioactifs. Les résultats montrent des effets contrastés des conditions gastriques, de la nature de l'émulsifiant, de la composition en acides gras et en tocophérols des huiles et de la présence de metmyoglobine sur la floculation et la coalescence des émulsions et sur les cinétiques de lipolyse intestinale et d'oxydation. L'importance de la balance entre pro et antioxydants, de l'insaturation et de la longueur de chaîne des acides gras, ainsi que de la présence des sucs digestifs ont ainsi été démontrés sur l'oxydation des acides gras selon la nature de l'émulsifiant et l'état de dispersion des lipides lors de leur arrivée en phase intestinale. Ainsi, le malonaldéhyde, les 4-HNE et 4-HHE sont formés pendant les phases gastrique et intestinale. Les données sur l'oxydation in vitro ont été comparées avec des résultats obtenus in vivo dans le contenu digestif et dans le plasma chez la souris.

Mots clés : structures, lipolyse, oxydation, AGPI n-3, interface, protéines, phospholipides

Structural and oxidative fate of lipids during in vitro digestion of model emulsions

Abstract

Recent data show that the nutritional benefits associated to the consumption of n-3 polyunsaturated fatty acids depend on the fate of lipid structures, including lipid oxidation, during digestion. The aim of this work was to determine the influence of the composition of digestion media on the evolution of the structures of emulsified lipids and the bioaccessibility and the oxidation of fatty acids. In vitro gastrointestinal digestion conditions, based on analysis of the literature and taking into account the constraints related to gas exchanges, were first set up and then used to digest emulsions stabilized by a protein or by surfactants. Interestingly, malonaldehyde, 4-HNE and 4-HHE were formed during both the gastric and intestinal phases. The results show contrasting effects of the gastric conditions, the emulsifier, the presence of metmyoglobin, and the fatty acid and tocopherols compositions of the oils on flocculation and coalescence of the emulsions, kinetics of lipolysis during the intestinal phase, and oxidation. The importance on oxidation of the balance between pro- and anti-oxidants, unsaturation and chain length of the fatty acids has been also confirmed. Depending on the nature of the emulsifier and the dispersion state of lipids at the beginning of intestinal phase the digestive juices exhibit or not protective effect on oxidation. The in vitro oxidation data were compared with results obtained in vivo in the gut contents and plasma of mice.

Keywords: structure, lipolysis, oxidation, n-3 PUFA, interface, proteins, phospholipids